Aus dem Institut für Veterinär-Hygiene
der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin
Direktor: Prof. Dr. H. Hartwigk

Untersuchungen über die Eignung des Rubrognost (Heyl & Co.) für den Nachweis Coliformer Keime im Harn

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Armin Landmann
Tierarzt aus Predel/Zeitz

Berlin 1966
Journal-Nr. 557

Aus dem Institut für Veterinär-Hygiene
der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin

Direktor: Professor Dr. H. Hartwigk

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE EIGNUNG DES RUEROGNOST (HEYL & CO.) FÜR DEN NACHWEIS COLIFORMER KEIME IM HARN

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Armin Landmann
Tierarzt aus Predel/ Zeitz

Berlin 1966

Journal - Nr. 557

Gedruckt mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin

Dekan: Prof. Dr. G. Bergmann

Referent: Prof. Dr. H. Hartwigk

Korreferent: Prof. Dr. Dr. h. c. M. Lerche

Tag der mündlichen Prüfung: 20. Dezember 1966

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Disposition

	Seite
Einleitung	2
Literaturübersicht	3 - 7
Eigene Versuche	8 - 43

A. Versuchsmaterial und Methoden

B. Ergebnisse

1. Der R-Test mit menschlichem Spontanharn
2. Einfluß eines menschlichen Harnes auf den R-Test
3. R-Test mit Bouillonkulturen bei Verdünnungen mit Harn in verschiedenen Reihenuntersuchungen mit zwei E. coli-Stämmen
4. R-Test mit Bouillonkulturfiltraten
5. R-Test mit Harn verschiedener p_H-Werte und mit "Pril"
6. R-Reaktionen bei verschiedenen Stammarten in Bouillonkulturverdünnungen mit sterilem Menschenharn
7. Mindestkeimzahlen für einen positiven R-Test durch Prüfung von verschiedenen Bakterienstämmen
8. Versuche der Keimzahlbestimmungen mittels Plattenverfahren in schwach bis stark positiven R-Bouillonkultur-Harnverdünnungen der Stämme E. coli, Pseudomonas aeruginosa und Providencia
9. Identifizierungsmöglichkeiten der Bakterienstämme auf Grund der Farb- und Konsistenzveränderungen der mit R. beschickten Röhrchen
10. R-Test mit Harnen von gesund erscheinenden Hunden
11. R-Test mit Harnen von Hunden mit klinischem Verdacht einer Erkrankung der harnableitenden Wege
12. R-Test mit Harn von fünf Rindern
13. R-Test mit Mittelstrahlharn von Rindern
14. Vergleichende Untersuchungen mit keimfrei filtriertem Menschen-, Hunde- und Rinderharn

Besprechung	44 - 50
Zusammenfassung	51 - 52
Literaturverzeichnis	53 - 58

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546527_0049

Einleitung

Das Rubrognost der Firma Heyl & Co., Berlin-Zehlendorf, ist eine synthetische Nährlösung auf der Basis des Triphenyltetrazoliumchlorids (TTC) nach Professor Schönberg, Hannover.

Diese Verbindung wird durch reduktasebildende Bakterien in eine rote Formazanverbindung übergeführt und kann daher zu deren Nachweis benutzt werden. Es wird von der Herstellerfirma darauf hingewiesen, daß hauptsächlich Keime durch das Rubrognost angezeigt werden, die der Coli-aerogenes-Gruppe angehören. Neben diesen Keimen bilden noch Bact. proteus, Bact.pyocyaneum (Pseudomonas aeruginosa), eiweißspaltende, toxin- und buttersäurebildende Bakterien Reduktase, so daß das Rubrognost als ein einfaches Hilfsmittel angesehen werden kann, Enterobakterien in Milch- und Wasserproben in kurzer Zeit festzustellen und zahlenmäßig indirekt zu erfassen.

Mir wurde die Aufgabe gestellt, Untersuchungen über die Frage durchzuführen, ob das Rubrognost zum Nachweis der in tierischen Harnen vorkommenden Keimarten und Keimzahlen geeignet ist.

L i t e r a t u r ü b e r s i c h t

Von 2, 3, 5-Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) ist schon lange bekannt, daß es durch Reduktionsmittel in rote Formazanverbindungen übergeführt werden kann. V. PECHMANN (35) beschrieb zusammen mit RUNGE eine solche Reduktion mit Schwefelammon bereits im Jahre 1894.

MÖLLER (30) erkannte später die Möglichkeit zur Ausnutzung dieser Eigenschaft in der Bakteriologie, als er die Reduktion von 2, 3-Diphenyl-5n-hexyl-tetrazoliumchlorid 1: 10 000 durch Milchsäurebakterien beobachtete. Die Bakterien färbten sich dabei an, während das Formazan in roten Flocken ausfiel.

WUNDT (47) stellte mittels in Bouillon befindlichen TTC-Verdünnungen weiterhin fest, daß abhängig von der Konzentration des TTC (1: 50 bis 1: 40 000) alle Bakterien reduktasepositiv sind. Er war der Meinung, daß diese Erscheinung deshalb nicht differentialdiagnostisch ausgenutzt werden könnte.

Der Vorteil gegenüber den bisher gebräuchlichen Präparaten wie Janusgrün, Resazurin, Indigokarmin und Methylenblau ist, so erkannten KUHN und JERCHEL (21), daß das Formazan gegenüber Sauerstoff stabil ist.

Eine erste praktische Ausnutzung der Eigenschaften des TTC wurde durch seine Einführung in die histologische und klinische Krebsdiagnostik durch STRAUS, CHERONIS und STRAUS (44) versucht, die nachweisen konnten, daß karzinomatöses Gewebe in der Lage ist, TTC zu rotem Formazan zu reduzieren. STÜTTGEN (45) stellte durch seine Versuche mit TTC und menschlichem Serum fest, daß im Gegensatz zur Reduktion des TTC durch benigne Tumorzellen dieselbe bei malignen Tumoren kein Charakteristikum ist. Weiterhin erkannte er, daß sich

der Diabetiker durch ein besonders negatives Redoxpotential des Serums auszeichnet, was durch eine bevorzugte Reduktion des Blutserums gekennzeichnet ist. Dabei konnte ausgeschlossen werden, daß dieser Effekt allein den erhöhten Blutzuckerwerten zuzuschreiben ist.

LIENHOP (27) konnte mittels TTC eine Lebensmittelvergiftung durch Bact. proteus im Stuhl nachweisen. Er beimpfte zunächst gewöhnliche Nähragarplatten mit der unverdünnten Stuhlprobe. Von da überimpfte er die Bakterien auf Agarplatten, die TTC in verschiedenen Verdünnungen enthielten. Er hob besonders die Hemmung des Schwärmens von Bact. proteus auf Agarplatten durch das TTC hervor. Auch konnte er sog. degenerierte Coli-Arten durch einen weißen, etwa 20 bis 25 % des Durchmessers der Kolonien betragenden Saum von intensiv rotgefärbten Escherichia coli-Kolonien unterscheiden.

MURANY (31) testete auf einer Plastikplatte in muldenartigen Vertiefungen mittels TTC und Bakteriensuspensionen verschiedene Desinfektionsmittel und kam zu dem Ergebnis, daß bei dieser Kleinstmethode nur eine schwache Reduktion eingetreten war, was durch die geringe Zahl überlebender Bakterien zu erklären ist. Die Meinung, daß TTC nur von lebenden Bakterien zu Formazan reduziert werden kann, wurde auch von WUNDT (47) vertreten.

Daß nur bestimmte Bereiche in den Bakterienzellen intensiv rot gefärbt sind, konnten BIELIG, KAUSCHE und HAARDICK (2) nachweisen. HIRSCH, CATTANEO und MAGGINI (12) bestätigten diese Feststellung mittels elektronenoptischer Untersuchungen an Mycobakterien.

MANN (29) konnte in Amerika mit Hilfe von Diphenyl-TTC psychrophile Bakterien erfassen und Antibiotika in der Milch mittels TTC nachweisen.

Eine Anwendung des TTC in der bakteriologischen Diagnostik erfolgte durch SCHÖNBERG (37, 38) und CHAPMAN (7), die es zum Nachweis von Escherichia coli in der Milch benutzten.

Nachdem KLIMMER-SCHÖNBERG (19) anfänglich zu diesem Zweck eine 0,1 %ige Triphenyltetrazoliumchloridlösung empfahlen, benutzte später SCHÖNBERG (39) eine Verdünnung von 1 : 450, die nach Beobachtungen von ihm Indikatoreigenschaften gegenüber E. coli besitzt, während sie gleichzeitig andere Bakterienarten weitgehend hemmt.

Mit dem Wachstum besonders von E. coli auf TTC-Laktose-Agar beschäftigte sich GERTH (8) und kam zu ähnlichen Ergebnissen. NOACH (33) bemerkte beim Wachstum coliformer Keime auf TTC-Agarplatten gegenüber Bromthymolblau-Trypaflavin-Laktose-Agar eine geringere Koloniezahl, dafür aber eine intensivere Färbung.

Hinsichtlich der Verdünnung des TTC zu seiner Anwendung in der Bakteriologie herrscht keine Einigkeit.

Während nach Vorschlag von SCHÖNBERG (39) eine Verdünnung von 1: 450 in Deutschland bei der Untersuchung coliformer Keime in der Milch üblich ist, benutzten LAKSHMINARAYANA und IYA (22) eine 0,01 %ige Lösung, MANN (29) verdünnte das TTC 1: 200 und MUSTAKALLIO, AHOS und AUTIO (32) sahen eine Verdünnung auf 10^{-4} als am günstigsten an.

Unter Benutzung von TTC ist auch eine indirekte Keimzahlbestimmung möglich. So beimpfte LAKSHMINARAYANA (22) TTC-haltige Bouillon mit keimhaltiger Milch, extrahierte das gebildete Formazan mit Butanol und bestimmte dessen Gehalt in der Milch mit einem Photometer, um so Rückschlüsse auf die Zahl der Bakterien in der Milch zu erhalten. Ferner war es möglich, durch

Vergleiche der Intensität der Rotfärbung von mit TTC beschickter Milch mit Standardlösungen die Keimzahl zu bestimmen.

KRAUß (20) beobachtete, daß mit dem Ansteigen des Bakteriengehaltes ein Abfall des Potentials verbunden ist. Seiner Meinung nach soll dieser Abfall in Zusammenhang mit den Stoffwechselvorgängen zu bringen sein. LAKSHMINARAYANA (22, 23, 24) machte die gleiche Beobachtung bei der Untersuchung der Veränderungen des Redoxpotentials verschiedener Bakterienarten. Dabei stellte er fest, daß ein Abfall des Redoxpotentials, am stärksten bei coliformen Bakterien ausgeprägt, mit einer intensiven Rotfärbung einhergeht.

KLEIN (17) stellte fest, daß bereits eine Verdünnung des TTC von 1: 450 unter Zusatz von Laktose hemmend auf E. coli wirkte, während Aerobacter, Coli intermedius, fluoreszierende Bakterienarten und Alkalibildner nicht gehemmt wurden. SEELEMANN und WEGENER (42) bezeichneten die von KLEIN (15, 16) ermittelten Keime als "coliforme Keime im weiteren Sinne" und wiesen darauf hin, daß sie alle zu den Darm-, Kot- und Schmutzbakterien zu rechnen und als Hinweis auf Verunreinigungen von Milch zu verwenden seien.

TTC hat sich besonders bei Vorliegen kleinerer Bakterienmengen als empfindlicher als Neotetrazolium, blaues Tetrazolium und Methylenblau erwiesen (MUSTAKALLIO, AHOS und AUTIO (32)).

Bei der Keimbestimmung auftretende unterschiedliche Reaktionen wurden von KLEIN (15, 16), SEELEMANN und WEGENER (42) auf eine unterschiedliche Bakterizidie des TTC gegenüber den coliformen Bakterien zurückgeführt. HEYL, HOLTHOFF und SCHONBORN (10) jedoch waren der Meinung, daß diese Abweichungen

auf Grund der biologischen Inkonstanz der benutzten Bouillons entstanden sein könnten. Sie entwickelten deshalb ein synthetisches TTC-Nährmedium - R u b r o g n o s t - , das coliforme Keime in Milch, Wasser, Speiseeis etc. erfaßt. Nach den Versuchsergebnissen von WORSECK und HOLST (46) ist dieses TTC-System ebenso brauchbar wie drei weitere (Bayer, Berlin-Chemie und Merck) in Deutschland benutzte.

Die erfolgreiche Anwendung des TTC zur Ermittlung verunreinigender coliformer Keime in Milch und Wasser ließ die Frage interessant erscheinen, ob auch die Untersuchungen von Harn auf diese Weise möglich ist. Da im Harn von Hunden bei krankhaften Veränderungen der Harnorgane häufig coliforme Keime vorliegen (KLEMM (18), LANGE (25)), schien diese Frage nicht unberechtigt zu sein. Auch SACHSE und POSER (36) stellten an erster Stelle coliforme Keime bei Erkrankungen der Harnorgane des Menschen fest. Sie, MALAMOS, DIAKOS, ATHANASIADOU und DERNITZAKIS (28), LAUBINGER (26), SIMMONS und WILLIAMS (43) sowie BAEDER (1) geben eine Zahl von 10^5 Bakterien pro Milliliter als Grenze zwischen pathologischem und unverdächtigem Harn an.

BRUUN JENSEN (4) machte mit Hilfe von "Uroscreen" (TTC) eine Bakteriurie bei mehr als 100 000 Keimen pro Milliliter sichtbar. Er erkannte an Hand seiner Versuche, daß Chemotherapeutika im Harn die Reduktion von TTC wesentlich beeinflußten und daß deshalb das TTC wenig geeignet ist, bei bereits behandelten Patienten eine Bakteriurie nachzuweisen.

Im Falle der Brauchbarkeit des TTC zum Nachweis coliformer Keime in tierischem Harn wäre dem praktischen Tierarzt ein wertvolles diagnostisches Hilfsmittel gegeben, das die Isolierung und Identifizierung vorliegender Bakterien zwar nicht ersetzt, aber eine schnelle Information ermöglicht.

Eigene Versuche

A. Material und Methoden

Da angenommen wurde, daß das Rubrognost (R.) im Harn andere Eigenschaften haben könnte als in Milch, Wasser, Speiseeis usw., war zunächst zu klären, ob das R. in verdünntem oder unverdünntem Harn das Vorhandensein von Keimen anzeigt.

Dabei sollten die Keimarten, die sich durch eine positive R-Probe erfassen lassen, ermittelt und die Frage, bis zu welcher geringsten Keimzahl die Anzeige durch das R. möglich ist, geklärt werden.

Ob die Verwendung alter oder frischer Harne einen Einfluß auf die Formazanbildung durch coliforme Keime hat oder Änderungen der p_H-Werte des Harnes oder Glasspülmittel das Ergebnis des R-Testes beeinflussen können, war weiterhin zu prüfen. Ebenso sollte untersucht werden, ob die Farbe, der Bodensatz, die Konsistenz und der Trübungsgrad des Überstandes und der Niederschlag an den Gefäßwänden bzw. eine Kahmhautbildung auf der Oberfläche des R-Harngemisches über die vorliegenden Keimarten eine Aussage zulassen.

Das R. der Firma Heyl & Co. ist lichtempfindlich und wird in braunen Flaschen zu 100 oder 500 ml in den Handel gebracht. Es ist eine wäßrig-helle, klare Flüssigkeit, die die Bezeichnung "R-TTC-Nährlösung" trägt. Es ist möglich, das gebrauchsfertig gelieferte R. 20 Minuten im Dampftopf bei 100° C zu erhitzen, eine Maßnahme, die aus Sicherheitsgründen von Wichtigkeit für bereits in Röhrchen abgefüllte R-Nährlösung sein kann.

In der Gebrauchsanweisung heißt es, daß je 2,0 ml R-Nährlösung unter sterilen Kautelen in sterile, mit Wattestopfen verschlossene Reagenzröhrchen eingefüllt werden sollen. Zu 2,0 ml werden 1,0 ml der auf Keime zu prüfenden Untersuchungsmaterialien mit einer sterilen Pipette hinzugegeben. eine 18-stündige Bebrütung bei 37°C schließt sich an.

Nach dieser Zeit tritt je nach dem Grade des Gehaltes an coliformen Bakterien in den zu untersuchenden Proben eine verschieden intensive Rosa- bis Rotfärbung in Erscheinung. Die zur Kontrolle bei jeder Untersuchung mitbebrütete, nicht mit Untersuchungsmaterial beschickte Probe R-Nährlösung darf keine Verfärbung zeigen.

R. muß stets kühl und dunkel aufbewahrt werden. Das freundlicherweise von der Firma Heyl & Co. für die Versuche zur Verfügung gestellte R. wurde flaschenweise von der Firma abgeholt. Es wurde unangebrochen bis zu vier Monaten und angebrochen bis zu drei Wochen im Kühlschrank bei einer durchschnittlichen Temperatur vo + 4°C aufbewahrt.

Die für die Versuche benutzten Bakterienstämme wurden zum Teil der Stammsammlung des Institutes entnommen, zum Teil aus frischem Untersuchungsmaterial (Harn-, Kot- und Organproben) isoliert. Die Stammdifferenzierung erfolgte mit Hilfe des Nachweises der biochemischen Reaktionen, des Lysindecarboxylase-, des Phenylalanindesaminase- und des Cytochromoxydasetestes und bestimmter Prüfungen auf kulturelle und färberische Eigenschaften, wobei die Differenzierungsschemata von HALLMANN (9), KAUFFMANN (14) und BORMAN, STUART und WHEELER (3) zu Grunde lagen.

Reinkulturen aus Untersuchungsmaterial wurden durch mehrmaliges Übertragen einzelner Kolonien auf gewöhnliche Agar-, Drigalski- und Gassnerplatten erzielt. Die reingezüchteten Stämme

wurden bis zum Beginn der Versuche in Bouillonkulturen aufbewahrt.

Folgende Bakterienarten kamen zur Untersuchung:

Escherichia coli-Stamm Nr. O 16
" " " " W 36
" " " " N 39
" " " " 42
" " " " O 50
" " " " O 52
" " " " O 56
" " " " O 59
" " " " M 33/ Thu
" " " " 333/ 65
" " " " 58/ 65
" " " " Journal-Nr. 92/ 66
" " " " " " 93/ 66

Atypischer Escherichia coli nach KAUFFMANN (14) oder Paracolobactrum coliforme nach BORMAN, STUART und WHEELER (3) Untersuchungs-Journal-Nr. G 54/ 66 des Institutes für Veterinärhygiene

Citrobacter intermedius Journal-Nr. G 56/ 66
" " " " 82/ 66
Atypischer Enterobacter " " G 51/ 66
Aerobacter cloacae " " 865/ 64
" " " " 198/ 66
Providencia " " 74/ 66
" " " 192/ 66
Pseudomonas aeruginosa " " 280/ 66
" " (pigmentlos) " 269/ 66
" " " " G 140/ 66
" " Nr. 23
Proteus mirabilis
Proteus vulgaris Journal-Nr. 239/ 66
" " " " 342/ 66

Alcaligenes Journal-Nr. 316/ 66
" " " 340/ 66
Aerobacter aerogenes
Citrobacter intermedius
Staphylococcus aureus Gattung CaMP I 32 a
" " " SG 511
" "
" " apathogen
Staphylococcus albus
Vergrünende Streptokokken Journal-Nr. 152 A/ 66
Streptokokken " " 152 B/ 66
Corynebacterium renale
Salmonella oranienburg
" heidelberg
" montevideo
" enteritidis rostock
" enteritidis dublin
" thompson
" pullorum
" abortus bovis
" typhi murium
Clostridium perfringens vom Schaf

Um die Anzeigefähigkeit des R. im Harn zu untersuchen, wurde überwiegend menschlicher Harn wegen der Einfachheit der Gewinnung verwendet. Später kamen Harnproben von Rindern und Hunden zur Untersuchung.

10,0 ml der Versuchsharnproben wurden in der Regel mit zwei Normalösen Bouillonkultur beimpft und in sterilen Spitzröhrchen mit physiologischer Kochsalzlösung in Zweier- und Zehnerpotenzen verdünnt. Von jeder Verdünnung wurde 1,0 ml mit einer sterilen Pipette in ein 2,0 ml R. enthaltendes Reagenzröhrchen übertragen. Als Kontrolle liefen erstens ein Reagenzröhrchen

mit 2,0 ml R. und zweitens ein Reagenzröhrchen mit 2,0 ml R. und 1,0 ml sterilen menschlichen Spontanharnes mit. Außerdem wurde jeder menschliche Spontanharn in einer Menge von einer Normalplatinöse auf eine gewöhnliche Agarplatte zur Prüfung auf Keimgehalt und die eventuell vorliegenden Keimarten ausgeimpft.

Die mit R. beschickten Harn-Kochsalz-Verdünnungen, die Kontrollröhrchen und die beimpfte Agarplatte verblieben 24, 48 und 72 Stunden bei 37° C im Brutschrank. In gleichen Zeitabständen wurde das Ergebnis mit folgendem Beurteilungsschema abgelesen:

dunkelrot	= ++++
himbeerrot	= +++
hellrot	= ++
hellrosa	= +
knopfähnlicher hellrosafarbener Bodensatz	= ±

Um den Einfluß des Harnes auf die Formazanbildung zu erkennen, wurden die Verdünnungen der Harnproben überwiegend mit sterilem Harn in der Weise vorgenommen, daß in acht Spitzröhrchen je 1,8 ml Harn vorgelegt wurden. In das erste Röhrchen wurden 0,2 ml einer 24-stündigen Bouillonkultur der verschiedenen Stammarten gegeben (Verdünnung 10^{-1}). Nach guter Durchmischung wurden von diesem Röhrchen 0,2 ml entnommen und in das zweite Röhrchen übertragen und so fort bis zur Verdünnung 10^{-8}. 1,0 ml wurden von jedem Röhrchen dieser Reihe entnommen und in ein korrespondierendes Röhrchen einer zweiten Röhrchenreihe verbracht. Zu jedem Röhrchen kamen 2,0 ml R. Dann schloß sich eine Bebrütung bis zu 72 Stunden an mit einer Beurteilung des Ergebnisses nach 24, 48 und 72 Stunden. Auf die Beurteilung nach 48- und 72-stündiger Bebrütung wurde Wert gelegt, um spät eintretende Farbveränderungen noch zu erfassen.

Zur Beantwortung der Frage, bei welcher Zahl von Keimen im Harn das R. die Keime noch nachweist, wurden Keimzählungen mit der Blutzählkammer nach Thoma in den Verdünnungen 10^{-2} bzw. 10^{-3} durchgeführt. Die Keime wurden vorher durch 10 %iges Formalin abgetötet, um eine Eigenbewegung auszuschließen.

Neben der Direktzählung wurden ferner kulturelle Keimzahlbestimmungen in den Verdünnungen 10^{-5} bis 10^{-7} vorgenommen. Dabei bedienten wir uns gewöhnlicher Nähragarplatten. Die Oberfläche des Nähragars wurde mit 0,1 ml der auf Keimzahl zu prüfenden Verdünnungen und 0,2 ml R. beschickt und die Flüssigkeit mit einem sterilen Drigalskispatel gut verteilt. Nach 24-stündiger Bebrütung bei 37° C waren die meisten Keimarten durch eine rote Farbe der Kolonien gut erkennbar, so daß sie leicht ausgezählt werden konnten.

B. Ergebnisse

1. Der R-Test mit menschlichem Spontanharn

10,0 ml eines menschlichen Spontanharnes wurden mit je zwei Ösen 72-stündiger Bouillonkulturen von E. coli O 18, E. coli W 36, E. coli N 39, E. coli O 50, E. coli O 52, E. coli O 56 und E. coli O 59 beimpft. Von dem mit Colibakterien beimpften Harn wurden absteigende Verdünnungen von 1: 1, 1:2, 1: 4, 1: 5, 1: 8, 1: 10 usw. bis zu 10^{-7} mit physiologischer Kochsalzlösung hergestellt. Je 1,0 ml der Harn-Kochsalz-Verdünnungen wurden in ein Reagenzröhrchen pipettiert, das vorher mit 2,0 ml R. beschickt worden war. Je eine Kontrolle mit 2,0 ml R. allein und 2,0 ml R. und 1,0 ml Spontanharn liefen mit. Eine gewöhnliche Nähragarplatte wurde zur Prüfung auf Keimfreiheit mit einer Öse des Spontanharnes beimpft.

Bei den Verdünnungen bis zu 10^{-6} trat eine Rotfärbung nach 24-, 48- und 72-stündiger Bebrütung ein. Die Intensität der Rotfärbung nahm proportional dem Verdünnungsgrad ab. War das Röhrchen mit unverdünntem beimpften Harn tief dunkelrot gefärbt, so lag bei den Verdünnungen 1: 1 und 1: 2 ein weniger dunkles Rot vor, das bei den Verdünnungen 1: 4 bis 1: 800 noch heller wurde und schließlich bei den Verdünnungen 10^{-3} bis 10^{-6} noch rosa war. Das als Kontrolle dienende R. blieb farblos. Das R. mit unverdünntem menschlichen Spontanharn war dunkelrot. In Übereinstimmung hiermit zeigte die mit Spontanharn beimpfte Nähragarplatte ein Wachstum von zwei Kolonien coliformer Keime.

Wenige im Harn vorhandene coliforme Keime wurden durch den R-Test angezeigt. Die Intensität der Rotfärbung war von dem Verdünnungsgrad abhängig.

Bei menschlichen Spontanharnproben war nicht mit einem Freisein von coliformen Keimen zu rechnen. Da keimfreien Harnproben bestimmte Keimarten zugesetzt und diese wiederum durch das R. angezeigt werden sollten, mußten mithin alle Versuchsharnproben vor Beginn der Versuche keimfrei filtriert werden.

2. Einfluß eines menschlichen Harnes auf den R-Test

Durch keimfreie Filtration steril gemachter Menschenharn wurde mit physiologischer Kochsalzlösung bis zu 10^{-8} verdünnt. Von jeder Verdünnung wurden 1,0 ml auf ein zweites Reagenzröhrchen übertragen und zu diesem 2,0 ml R. unter sterilen Bedingungen gegeben. In gleicher Weise wurde ein Kontrollröhrchen mit 1,0 ml physiologischer Kochsalzlösung und 2,0 ml R. beschickt. Jedes Röhrchen wurde mit zwei Normalösen einer 72 Stunden alten Bouillonkultur des E. coli-Stammes N 39 beimpft. Als weitere Kontrollen wurden 2,0 ml R. allein und 2,0 ml R. mit 1,0 ml keimfrei filtrierten Harnes mitgeführt. Die Kontrollröhrchen wurden nicht beimpft.

Nach 24-, 48- und 72-stündiger Bebrütung bei 37° C zeigten außer den beiden Kontrollen alle Harnverdünnungsstufen eine gleichartige hellrote Farbe. Dies war ein Zeichen dafür, daß die Formazanbildung durch die Colibakterien weder vom konzentrierten noch vom verdünnten Harn beeinflußt worden war. Die hellrote Farbe ging wahrscheinlich auf relativ geringe Keimzahlen, die in die einzelnen Röhrchen übertragen worden waren, zurück.

3. R-Test mit Bouillonkulturen bei Verdünnungen mit Harn in verschiedenen Reihenuntersuchungen mit zwei E. coli-Stämmen

Eine 8-tägige E. coli-Bouillonkultur des Stammes N 39 wurde in Zehnerpotenzen mit s t e r i l e m Menschenharn bis zu einer Verdünnung von 10^{-8} verdünnt. Der Verdünnungsversuch

wurde bis zur Verdünnung 10^{-1} in zwei Röhrchenreihen, in der Verdünnung 10^{-2} in drei, 10^{-3} in vier und 10^{-4} und darüber in fünf Reihen durchgeführt. Von der Verdünnungsstufe 10^{-1} wurden 0,1 ml entnommen und mit 0,9 ml einer 10 %igen Formalinlösung zwecks direkter Keimzählung versetzt. Die Zählung ergab 605 000 Keime in 1 ml der Verdünnung 10^{-2}, so daß in der Verdünnung 10^{-1} mit einer Keimzahl von 6 050 000 Keimen/ 1 ml gerechnet werden konnte.

Aus allen Verdünnungsstufen wurden je 1,0 ml entnommen, in ein Röhrchen pipettiert und diesen 2,0 ml R. zugefügt. Die Kontrollen wurden wie üblich mitgeführt.

Nach 24-stündiger Bebrütung bei 37°C wurde bis zu einer Verdünnung von 10^{-2} eine Formazanbildung durch Rosafärbung angezeigt, die nach 66-stündiger Bebrütung dunkelrot war. In den Stufen über 10^{-2} zeigte sich bis zur Bebrütung von 66 Stunden keine Rotfärbung.

In allen zwei bis fünf Röhrchenreihen waren die Ergebnisse die gleichen. Der Versuch wurde unter Verwendung einer 72-stündigen Bouillonkultur des E. coli-Stammes 42 wiederholt. Dabei ergab sich ebenfalls eine Übereinstimmung in der Rotfärbung der angesetzten verschiedenen Röhrchenreihen, aber die Rotfärbung zeigte sich noch bis zu einer Verdünnung von 10^{-8}, wobei die Farbintensität bei steigender Verdünnung abnahm.

Die ungünstige Anzeige der Colikeime im ersten Versuch ist auf eine Überalterung der verwendeten 8-tägigen Bouillonkultur und ein verfrühtes Absterben der in der Kultur enthaltenen Keime zurückzuführen. Das Ergebnis des zweiten Versuches dürfte daher als zutreffend anzusehen sein.

4. R-Test mit Bouillonkulturfiltraten

Aus 24-stündigen Bouillonkulturen von zehn verschiedenen Bakterienstämmen (Staph. aureus, Pseudomonas aeruginosa, Proteus vulgaris, E. coli O 59, Aerobacter aerogenes 865/64, vergrünenden Streptokokken, Staph. aureus apathogen, Alcaligenes, Salmonella enteritidis rostock, Salmonella typhi murium) wurden keimfreie Filtrate hergestellt und diese unverdünnt und 1: 1, 1: 2 , 1: 4 bis 1: 2848 mit sterilem Menschenharn verdünnt in Röhrchen zu 1,0 ml gegeben, mit 2,0 ml R. beschickt und bis zu acht Tagen bebrütet.

Es kam zu keiner Formazanbildung in den Röhrchen. Das gleiche Ergebnis wurde erzielt mit keimfreien Filtraten von 72 Stunden lang bebrüteten Bouillonkulturen der Stämme Aerobacter cloacae 864/65 und E. coli O 59.

Demnach wird die Formazanbildung nicht durch Kulturfiltrate hervorgerufen. Sie ist vielmehr nur möglich, wenn lebende Keime vorhanden sind.

5. R-Test mit Harn verschiedener p_H-Werte und mit "Pril"

Der Versuch wurde in zwei Röhrchenreihen angesetzt. 0,2 ml einer 24-stündigen Bouillonkultur von Citrobacter intermedius wurden mit je 1,8 ml sterilem Menschenharn, der auf die p_H-Werte 6,0 und 9,0 eingestellt war, in je einem Röhrchen vermischt (Verdünnung 10^{-1}) und von diesen Röhrchen weitere Verdünnungen bis zur Endstufe 10^{-8} hergestellt. In zwei weitere Röhrchenreihen wurden je Röhrchen 1,0 ml der Bouillonkultur-Harngemische gegeben und 2,0 ml R. jedem Röhrchen zugesetzt. Vier Kontrollen, und zwar ein Röhrchen mit 1,0 ml Bouillonkultur und 2,0 ml R., ein zweites Röhrchen mit 2,0 ml R. allein, ein drittes

Röhrchen mit 1,0 ml Harn mit dem p_H-Wert 6,0 und 2,0 ml R. und ein viertes Röhrchen mit 1,0 ml Harn des p_H-Wertes 9,0 und 2,0 ml R. liefen mit.
Alle Röhrchen wurden wie üblich 24, 48 und 72 Stunden bebrütet.
(Ergebnis siehe Tabelle 1)

Tabelle 1: Verdünnung einer 24-stündigen Bouillonkultur von Citrobacter intermedius mit Harn bei p_H 6,0 und 9,0

Verdünnungen	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	
nach 24 Stunden bei 37°C	+++	+++	++	++	++	++	++	+	p_H 9,0
	+++	+++	++	++	++	++	++	++	p_H 6,0
nach 48 Stunden bei 37°C	++++	++++	+++	+++	+++	+++	+++	++	p_H 9,0
	++++	++++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	p_H 6,0
nach 72 Stunden bei 37°C	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	p_H 9,0
	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	p_H 6,0

In allen Verdünnungsstufen (s. Tabelle) waren die Farbtöne bei den p_H-Werten 6,0 und 9,0 weitgehend gleich. In der Verdünnungsstufe 10^{-8} wurde bei einem p_H-Wert von 6,0 ein etwas dunklerer Farbton als bei den entsprechenden Röhrchen des p_H-Wertes 9,0 beobachtet.

Zwei sterile menschliche Harnproben, die einen p_H-Wert von 6,0 und 9,0 aufwiesen, wurden durch tropfenweises Zugeben 10 %iger Natronlauge oder Salzsäure mittels Kontroll-

messungen mit einem p_H-Meter der Firma Askania, Berlin, und einer Glaselektrode Typ 405 der Firma Ingold/ Frankfurt in ihren p_H-Werten um 0,5 im sauren Bereich bis auf 5,0 und 9,5 im alkalischen Bereich verändert. 1,0 ml der in den einzelnen Röhrchen befindlichen Harnproben wurde zu 2,0 ml R. gegeben und die Gemische bis zu 72 Stunden bebrütet. In keinem Röhrchen kam es zu einer Rotfärbung.

Aus den Ergebnissen war zu schließen, daß der p_H-Wert des Harnes auf die Formazanbildung keinen wesentlichen Einfluß hat.

Inwieweit das Gläserspülmittel "Pril" einen reduzierenden Effekt auf das R. ausübt, wurde folgendermaßen geprüft:

In ein Röhrchen wurde 1,0 ml physiologische Kochsalzlösung pipettiert. Dazu wurde eine Messerspitze des Waschmittels "Pril" hinzugegeben. Ein zweites Röhrchen wurde mit 1,0 ml sterilen Harn beschickt und ebenfalls mit einer Messerspitze "Pril" versehen. In gleicher Weise wurde ein Filtrat einer 72 Stunden alten Bouillonkultur E. coli ohne Nr. behandelt. Jedem dieser Röhrchen wurden 2,0 ml R. zugegeben. Eine Bebrütung bis zu 72 Stunden schloß sich an.

Alle drei Röhrchen blieben farblos, so daß ein Einfluß des Spülmittels "Pril" auf das Ergebnis des R-Testes nicht anzunehmen war.

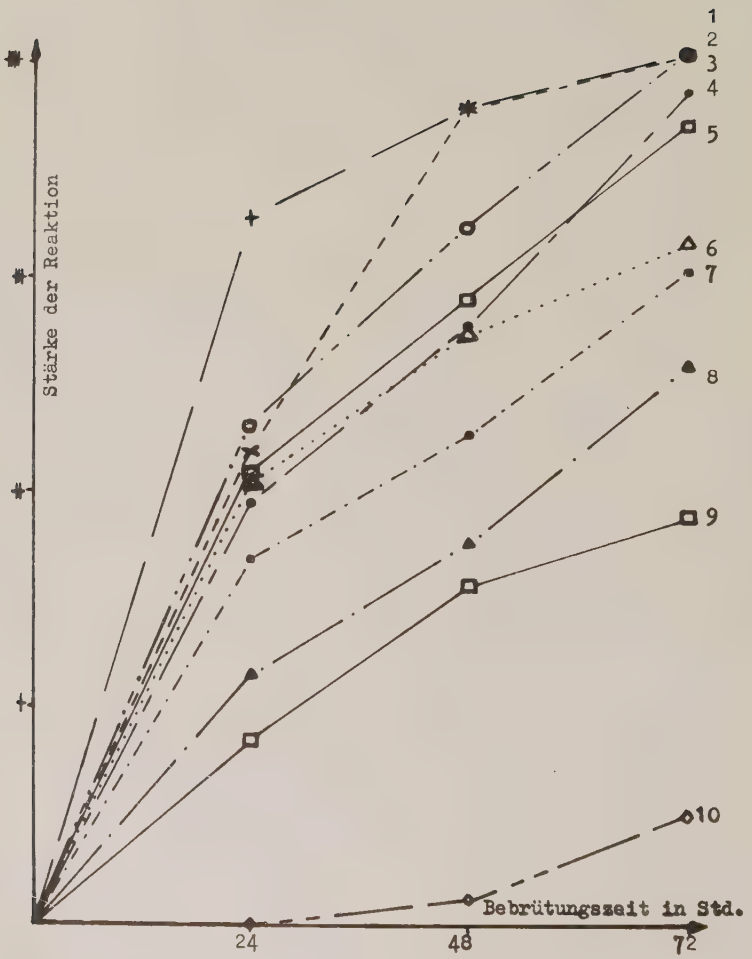
6. R-Reaktionen bei verschiedenen Stammarten in Bouillonkulturverdünnungen mit sterilem Menschenharn

24-stündige Bouillonkulturen wurden in üblicher Weise mit sterilem Menschenharn 10^{-1} bis 10^{-8} verdünnt und dann im R-Test nach 24, 48 und 72 Stunden geprüft.

Zur Prüfung kamen:

a.) 15 Stämme von E. coli
b.) 3 Stämme von Citrobacter intermedius
c.) 3 Stämme von Aerobacter (-aerogenes 1 Stamm, - cloacae 2 Stämme)
d.) 3 Stämme von Proteus
e.) 2 Stämme von Providencia
f.) 2 Stämme von Alcaligenes
g.) 6 Stämme von Pseudomonas aeruginosa
h.) 9 Stämme von Salmonellen
i.) 4 Stämme von Streptokokken
j.) 5 Stämme von Staphylokokken
k.) 2 Stämme von Corynebacterium renale
l.) 1 atypischer Enterobacter-Stamm

Die Ergebnisse wurden in Kurven dargestellt, indem auf der Ordinate die Stärke der Reaktionen und auf der Abzisse die Zeit der Bebrütung aufgetragen wurde.



1 Providencia
2 Citrobacter intermedius
3 Aerobacter
4 Alcaligenes
5 E. coli (24 Std.-Kultur)
6 Salmonella
7 Bact. proteus
8 Pseudomonas aeruginos
9 E. coli (72 Std.-Kultur)
10 Atypischer Enterobacter

Aus den Kurvenverläufen ergibt sich, daß bei allen geprüften Stämmen die Formazanbildung schon nach 24-stündiger Bebrütung im Harn zu erkennen war. Nach 48- und 72-stündiger Bebrütung nahm die Rotfärbung noch geringgradig zu. Bei den Stämmen der Gattung Providencia, Citrobacter, Aerobacter, Alcaligenes und E. coli war die Rotfärbung am stärksten. Bei den Stämmen der Gattung Proteus, Salmonella, Pseudomonas aeruginosa war sie etwas schwächer. Sehr gering war die Rotfärbung bei dem atypischen Enterobacter-Stamm. Die Rotfärbung setzte bei diesem Stamm erst nach 48-stündiger Bebrütung ein und stieg geringgradig nach 72 Stunden Bebrütungszeit.

Mit vier verschiedenen Stämmen von E.coli wurden die gleichen Ansätze unter Benutzung von 24-stündigen (Kurve Nr. 5) und 72-stündigen (Kurve Nr. 9) Bouillonkulturen durchgeführt. Dabei zeigte sich, daß erheblich stärkere Rotfärbungen mit 24-stündigen Bouillonkulturen als mit 72-stündigen Bouillonkulturen erzielt wurden.

Fünf in gleicher Weise geprüfte Staphylokokken-Stämme, vier Streptokokken-Stämme und zwei Stämme von Corynebacterium renale ließen trotz mehrmaliger Wiederholung der Versuche keine Formazanbildung in den Harnkulturverdünnungen erkennen. Eine Rotfärbung wurde lediglich dann beobachtet, wenn die unverdünnte Kultur mit R. vermischt und bebrütet wurde.

Ein gleicher Versuch wurde noch mit Clostridium perfringens durchgeführt. In einem Falle wurde das R-Kulturgemisch im evakuierten Exsiccator, in einem anderen Falle durch Überschichtung mit flüssigem Paraffin unter anaeroben Bedingungen bebrütet. Es blieb in beiden Fällen eine Rotfärbung aus.

Um zu erfahren, ob die Anaerobiose für das Ausbleiben der Formazanbildung verantwortlich war, wurde der als guter Formazanbildner bekannte E. coli-Stamm O 18 nach Zusammenbringen mit einer 24-stündigen Kultur mit R. unter anaeroben Bedingungen bebrütet. Dabei zeigte sich, daß die Intensität der Rotfärbung genau so gut war wie bei einer Bebrütung unter aeroben Bedingungen und die Rotfärbung bis zu einer Verdünnung von 10^{-8} in Erscheinung trat.

7. Mindestkeimzahlen für einen positiven R-Test durch Prüfung von verschiedenen Bakterienstämmen

In 24-stündigen Bouillonkulturen verschiedener Keimarten wurden die Keimzahlen durch direkte Zählung in der Zählkammer oder durch das kulturelle Zählverfahren bestimmt. Dabei gingen wir bei der direkten Zählung von der Bouillonkultur-Harnverdünnung 10^{-2} oder 10^{-3} aus, während beim Plattenzählverfahren von den Kultur-Harnverdünnungen 10^{-5} bis 10^{-7} ausgegangen wurde. Die mit beiden Zählverfahren ermittelten Keimzahlen wurden auf die Endverdünnungsstufe berechnet, in der noch zweifelsfrei das Ergebnis des R-Testes bei Zugrundelegung einer 24-stündigen Bebrütung nachzuweisen war.

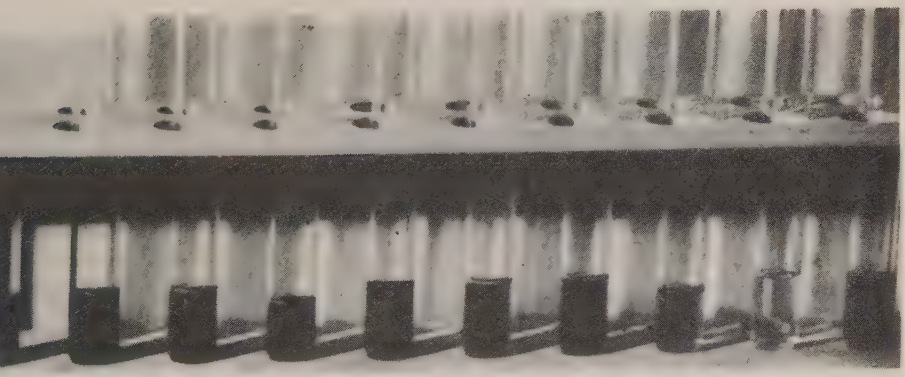
Die Ergebnisse sind aus den Tabellen 2 bis 14 ersichtlich.

Sofern der R-Test nach 48- und 72-stündiger Bebrütung noch in höheren Verdünnungen positive Ergebnisse zeigte, wurden diese in vier weiteren vertikalen Spalten eingezeichnet.

a.) E. coli-Stämme

Vierzehn verschiedene E. coli-Stämme wurden in der beschriebenen Weise geprüft. Davon wurden die Untersuchungen von vier Stämmen (E. coli o. Nr., E. coli O 39, E. coli 92/ 66, E. coli 93/ 66) zweimal an verschiedenen Tagen durchgeführt. Die Ergebnisse zeigt die Tabelle 2.

R-Test einer Bouillonkultur-Harnverdünnung mit einem E. coli-Stamm nach 48-stündiger Bebrütung



(von links nach rechts: Verdünnung 10^{-1} bis 10^{-9} und Kontrollröhrchen mit unverdünnter Bouillonkultur)

Tabelle 2: Errechnete Keimzahlen in den Endverdünnungsstufen mit positivem R-Test 24-stündiger Kulturen von vierzehn E. coli-Stämmen

		n. 24 Stunden Bebrütung		Vor Bebrütung ermittelte Keimzahl für Endstufe n. 24 Stunden Bebrütung		n. 48 Stunden Bebrütung		n. 72 Stunden Bebrütung	
		Endstufe	R-Test	Direkt	Indirekt	Endstufe	R-Test	Endstufe	R-Test
E. coli	1.	10^{-8}	+	18	16	/	/	/	#
	2.	10^{-8}	+	24	19	/	#	/	##
E. coli 039	1.	10^{-8}	#	11	9	/	/	/	##
	2.	10^{-8}	#	107	101	/	###	/	/
E. coli 92/66	1.	10^{-8}	+	23	19	/	##	/	##
	2.	10^{-6}	+	345	255	10^{-9}	+	10^{-8}	#
E. coli 93/66	1.	10^{-8}	+	29	26	/	#	/	###
	2.	10^{-8}	+	37	30	/	#	/	###
E. coli 018		10^{-8}	+	7	6	/	#	/	#
E. coli W 36		10^{-7}	+	52	49	10^{-8}	+	/	#
E. coli 42		10^{-8}	+	12	10	/	#	/	#
E. coli 050		10^{-7}	+	96	93	10^{-8}	+	/	#
E. coli 052		10^{-7}	#	95	87	/	#	/	##
E. coli 056		10^{-8}	+	17	12	/	#	/	#
E. coli 059		10^{-7}	+	31	23	/	#	/	#
E. coli M 33 I Thu		10^{-8}	+	12	9	/	#	/	#
E. coli 333 I 65		10^{-7}	+	95	69	10^{-8}	+	/	#
Atyp. E. coli		10^{-8}	#	11	9	/	#	/	/

/ bedeutet für alle Tabellen gleichbleibend.

Die errechneten Keimzahlen in den Endverdünnungsstufen, die noch deutlich eine Formazanbildung erkennen ließen, schwankten bei den verschiedenen Stämmen zwischen 6 und 345 Keimen / 1 ml. Die mit dem direkten und indirekten Zählverfahren ermittelten Keimzahlen wiesen eine gute Übereinstimmung auf. Bei den meisten Stämmen lag die Keimzahl bei den Endverdünnungsstufen 10^{-7} und 10^{-8} unter 100 Keimen / 1 ml. Nur bei dem Stamm E. coli 92/66 wurden 345 (direkte Zählung) und 255 (indirekte Zählung) Keime / 1ml in der Verdünnung 10^{-6} gezählt.

Dieses Ergebnis stimmt nicht mit dem Ergebnis mit dem gleichen Stamm überein, das in der Verdünnung 10^{-8} 23 bzw. 19 Keime / 1 ml ergeben hatte. Bei 48- und 72-stündiger Bebrütung zeigte sich dann allerdings, daß der R-Test noch in der Verdünnung 10^{-7} und 10^{-8} positiv ausfiel.

Bei drei weiteren Colistämmen (E. coli W 36, E. coli O 50 und E. coli 333/65) kam es nach 48-stündiger Bebrütung noch zu einer Spätreaktion, wobei allerdings zu bemerken ist, daß die Intensität der Rotfärbung bei den meisten Stämmen nach verlängerter Bebrütung zunahm.

Mit vier E. coli-Stämmen (E. coli O 18, E. coli 42, E. coli M 33/ Thu und E. coli 58/65) wurde der gleiche Versuch mit 72-stündigen Bouillonkulturen angesetzt (s. Tabelle 3).

Die errechneten Keimzahlen in den Endverdünnungsstufen, die noch einen positiven R-Test ergaben, lagen in diesem Fall erheblich höher als bei den Versuchen mit 24-stündigen Kulturen. Sie bewegten sich zwischen 113 500 bis 28 000 000 Keimen / 1 ml in den Endstufen 10^{-2} und 10^{-4}.

Tabelle 3: Errechnete Keimzahlen in den Endverdünnungsstufen mit positivem R-Test 72-stündiger Kulturen von vier E. coli-Stämmen

	n. 24 Stunden Bebrütung		Vor Bebrütung ermittelte Keimzahl für Endstufe n. 24 Stunden Bebrütung		n. 48 Stunden Bebrütung		n. 72 Stunden Bebrütung	
	Endstufe	R-Test	Direkt	Indirekt	Endstufe	R-Test	Endstufe	R-Test
E. coli 018	10^{-4}	+	154500	113500	10^{-5}	+	10^{-6}	+
E. coli 42	10^{-3}	+	316500	281300	10^{-5}	+	10^{-8}	+
E. coli M33/Thu	10^{-4}	+	430000	399500	10^{-5}	+	/	+++
E. coli 58/65	10^{-2}	+	28000000	20800000	10^{-3}	+	/	+++

Tabelle 4: Errechnete Keimzahlen in den Endverdünnungsstufen mit positivem R-Test 24-stündiger Kulturen von drei Citrobacter intermedius-Stämmen

	n. 24 Stunden Bebrütung		Vor Bebrütung ermittelte Keimzahl für Endstufe n. 24 Stunden Bebrütung		n. 48 Stunden Bebrütung		n. 72 Stunden Bebrütung	
	Endstufe	R-Test	Direkt	Indirekt	Endstufe	R-Test	Endstufe	R-Test
Citrobacter intermedius	10^{-8}	++	6	6	/	+++	/	+++
Citrobacter intermedius a56/66	10^{-8}	++	20	20	/	+++	/	/
Citrobacter intermedius 82/66	10^{-8}	+	13	12	/	+++	/	/

b.) Citrobacter intermedius (Tab. 4)

Die Versuchsanordnung war die gleiche wie bei der Prüfung von E. coli. Die Ergebnisse wurden in Tabelle 4 zusammengestellt.

Nach 24-stündiger Bebrütung war eine deutliche positive Reaktion bei den Verdünnungen 10^{-8} festzustellen. Die Keimzahlen bewegten sich zwischen 6 und 20 Keimen/ 1 ml.

c.) Aerobacter (Tab. 5)

Drei Stämme wurden geprüft.

Nach 24-stündiger Bebrütung war in den Verdünnungen 10^{-8} eine Rotfärbung zu erkennen.
Keimzahlen: 4 bis 13 Keime/ 1 ml.

d.) Bact. proteus (Tab. 6)

Bei einem Stamm von Proteus mirabilis war nach 24 Stunden eine Formazanbildung nur in der Verdünnung 10^{-3} erkennbar. Die Keimzahlen betrugen 125 000 bzw. 117 500 / 1 ml. Erst nach 48-stündiger Bebrütung war eine Rotfärbung auch in der Verdünnung 10^{-8} vorhanden. Bei den anderen beiden Stämmen lag die Endstufe der positiven Reaktion bei 10^{-8} mit Keimzahlen von 19 und 15 bzw. 30 und 27 Keimen/ 1 ml.

e.) Providencia (Tab.7)

Wieder lag die positive R-Reaktion bei der Endverdünnung 10^{-8} mit 19 oder 17 und 43 oder 42 Keimen/ 1 ml.

Tabelle 5: Errechnete Keimzahlen in den Endverdünnungsstufen mit positivem R-Test 24-stündiger Kulturen von drei Aerobacter-Stämmen

	n. 24 Stunden Bebrütung		Vor Bebrütung ermittelte Keimzahl für Endstufe n. 24 Stunden Bebrütung		n. 48 Stunden Bebrütung		n. 72 Stunden Bebrütung	
	Endstufe	R-Test	Direkt	Indirekt	Endstufe	R-Test	Endstufe	R-Test
Aerobacter cloacae 198/66	10^{-8}	+	11	10	/	#	/	###
Aerobacter cloacae 865/64	10^{-8}	#	13	12	/	##	/	###
Aerobacter aerogenes	10^{-8}	+	4	4	/	#	/	###

Tabelle 6: Errechnete Keimzahlen in den Endverdünnungsstufen mit positivem R-Test 24-stündiger Kulturen von drei Bact. proteus-Stämmen

	n. 24 Stunden Bebrütung		Vor Bebrütung ermittelte Keimzahl für Endstufe n. 24 Stunden Bebrütung		n. 48 Stunden Bebrütung		n. 72 Stunden Bebrütung	
	Endstufe	R-Test	Direkt	Indirekt	Endstufe	R-Test	Endstufe	R-Test
Proteus vulgaris 239/66	10^{-8}	+	30	27	/	#	/	/
Proteus vulgaris 342/66	10^{-8}	+	19	15	/	#	/	##
Proteus mirabilis	10^{-3}	+	125 000	117 700	10^{-8}	+	/	#

f.) Alcaligenes Tab. 8)

Die Endstufen mit positiven Reaktionen lagen bei 10^{-6} und 10^{-8}. Bei der Verdünnung 10^{-8} betrug die Keimzahl 8 Keime / 1 ml, bei der Verdünnung 10^{-6} 850 bzw. 695 Keime / 1 ml. Die verlängerte Bebrütung ergab bei dem Stamm 340/66 noch eine positive Reaktion bei der Verdünnung 10^{-8}.

g.) Pseudomonas aeruginosa (Tab. 9)

Die Endverdünnungen mit positiven R-Reaktionen bewegten sich zwischen 10^{-3} und 10^{-8}. Bei hohen Verdünnungszahlen schwankten die Keimzahlen zwischen 11 und 380 Keimen / 1ml. Bei den niedrigen Verdünnungen 10^{-4} und 10^{-3} lagen die Keimzahlen wesentlich höher. In diesen Fällen kam es aber noch zu Spätreaktionen.

h.) Salmonellen (Tab. 10)

Sieben Salmonella-Stämme ergaben eine Rotfärbung in der Endstufe 10^{-8} bei Keimzahlen von 7 bis 35 Keimen / 1 ml. Zwei Salmonella-Stämme (Salmonella pullorum und Salmonella abortus bovis) zeigten nach 24-stündiger Bebrütung einen positiven R-Test in den Verdünnungen 10^{-2} und 10^{-1} mit Keimzahlen von 4 950 000 oder 4 253 000 bzw. 12 550 000 oder 11 470 000 Keimen /1 ml.

Bei Salmonella pullorum traten nach 48- und 72-stündiger Bebrütung noch Spätreaktionen bei den Verdünnungen 10^{-5} bzw. 10^{-6}, bei Salmonella abortus bovis bei den Verdünnungen 10^{-2} ein.

Tabelle 7: Errechnete Keimzahlen in den Endverdünnungsstufen mit positivem R-Test 24-stündiger Kulturen von zwei Providencia-Stämmen

	n. 24 Stunden Bebrütung		Vor Bebrütung ermittelte Keimzahl für Endstufe n. 24 Stunden Bebrütung		n. 48 Stunden Bebrütung		n. 72 Stunden Bebrütung	
	Endstufe	R-Test	Direkt	Indirekt	Endstufe	R-Test	Endstufe	R-Test
Providencia 74/66	10^{-8}	##	19	17	/	###	/	/
Providencia 192/66	10^{-8}	##	43	42	/	/	/	###

Tabelle 8: Errechnete Keimzahlen in den Endverdünnungsstufen mit positivem R-Test 24-stündiger Kulturen von zwei Alcaligenes-Stämmen

	n. 24 Stunden Bebrütung		Vor Bebrütung ermittelte Keimzahl für Endstufe n. 24 Stunden Bebrütung		n. 48 Stunden Bebrütung		n. 72 Stunden Bebrütung	
	Endstufe	R-Test	Direkt	Indirekt	Endstufe	R-Test	Endstufe	R-Test
Alcaligenes 516/66	10^{-8}	+	8	8	/	##	/	##
Alcaligenes 340/66	10^{-6}	+	850	695	10^{-8}	##	/	###

Tabelle 9: Errechnete Keimzahlen in den Endverdünnungsstufen mit positivem R-Test 24-stündiger Kulturen von sechs Pseudomonas aeruginosa-Stämmen

	n. 24 Stunden Bebrütung		Vor Bebrütung ermittelte Keimzahl für Endstufe n. 24 Stunden Bebrütung		n. 48 Stunden Bebrütung		n. 72 Stunden Bebrütung	
	Endstufe	R-Test	Direkt	Indirekt	Endstufe	R-Test	Endstufe	R-Test
Ps. aerug. 23	10^{-7}	+	35	30	10^{-8}	+	/	#
Ps. aerug.	10^{-8}	+	12	11	/	/	/	#
Ps. aerug. 280166	10^{-7}	+	380	302	10^{-8}	+	/	#
Ps. aerug. G 140166	10^{-4}	+	25 000	21000	10^{-5}	+	10^{-6}	+
Ps. aerug. 269/66 pigmentlos	10^{-5}	+	133 500	106400	10^{-7}	+	/	/
Ps. aerug	10^{-7}	+	13	12	/	#	/	#

Tabelle 10: Errechnete Keimzahlen in den Endverdünnungsstufen mit positivem R-Test 24-stündiger Kulturen von neun Salmonella-Stämmen

	n 24 Stunden Bebrütung		Vor Bebrütung ermittelte Keimzahl für Endstufe n. 24 Stunden Bebrütung		n. 48 Stunden Bebrütung		n. 72 Stunden Bebrütung	
	End-stufe	R-Test	Direkt	Indirekt	End-stufe	R-Test	End-stufe	R-Test
S. oranienburg	10^{-8}	++	9	7	/	+++	/	/
S. heidelberg	10^{-8}	++	12	11	/	+++	/	/
S. montevideo	10^{-8}	++	13	12	/	+++	/	+++
S. enteritidis rostock	10^{-8}	+++	12	9	/	/	/	+++
S. enteritidis dublin	10^{-8}	++	35	29	/	+++	/	/
S. thompson	10^{-8}	++	12	10	/	+++	/	/
S. typhi murium	10^{-8}	++	25	19	/	+++	/	/
S. pullorum	10^{-2}	+	4950000	4253000	10^{-5}	+	10^{-6}	+
S. abortus bovis	10^{-1}	+	12550000	11470000	/	/	10^{-2}	+

i.) Atypischer Enterobacter (Tab. 11)

Nur die unverdünnte Bouillonkultur wies nach 24-stündiger Bebrütung einen positiven R-Test mit einer Keimzahl von 630 000 000 oder 480 000 000 Keimen/ 1 ml auf. Erst nach 48 Stunden wurde der R-Test bei der Verdünnung 10^{-1} und nach 72 Stunden bei der Verdünnung 10^{-3} positiv.

j.) Staphylokokken (Tab. 12)

Bei drei Staphylokokken-Stämmen wurden die Versuche nach verschiedenen Zeiten wiederholt.

Die Einheitlichkeit der Ergebnisse bei den verschiedenen und gleichen Stämmen war unbefriedigend. Wiederholt wurde bei der Zählung im Plattenverfahren kein Wachstum beobachtet. Andererseits wurde aber bei gleichen Stämmen Wachstum erzielt, wenn ein hoher Keimgehalt bei der direkten Keimzählung vorlag. Die meisten Stämme waren im R-Test negativ. Nur in zwei Fällen kam es zu einer Formazanbildung bei Verwendung der unverdünnten Kultur.

k.) Streptokokken (Tab. 13)

Streptokokken scheinen auch ähnlich wie Staphylokokken schlechte Formazanbildner zu sein. Die Keimzahlen, die mit dem direkten und indirekten Zählverfahren ermittelt wurden, schwankten erheblich, was im wesentlichen darauf zurückzuführen sein dürfte, daß die direkte Zählung keine verläßlichen Werte ergab.

l.) Corynebacterium renale (Tab. 14)

Es kam zu einer schwachen Rotfärbung nur bei der Verwendung von unverdünnten Bouillonkulturen für den R.-Test.

Tabelle 11: Errechnete Keimzahlen in der Endverdünnungsstufe mit positivem R-Test einer 24-stündigen Kultur von einem atypischen Enterobacter-Stamm

	n. 24 Stunden Bebrütung		Vor Bebrütung ermittelte Keimzahl für Endstufe n. 24 Stunden Bebrütung		n. 48 Stunden Bebrütung		n. 72 Stunden Bebrütung	
	Endstufe	R-Test	Direkt	Indirekt	Endstufe	R-Test	Endstufe	R-Test
Atypischer Enterobacter G51/66	B-Kultur	##	630 000 000	480000 000	10^{-1}	+	10^{-3}	+

Tabelle 12: Errechnete Keimzahlen in den Endverdünnungsstufen mit positivem oder negativem R-Test 24-stündiger Kulturen von fünf Staphylokokken-Stämmen

		n. 24 Stunden Bebrütung		Vor Bebrütung ermittelte Keimzahl für Endstufe n. 24 Stunden Bebrütung		n. 48 Stunden Bebrütung		n. 72 Stunden Bebrütung	
		Endstufe	R-Test	Direkt	Indirekt	Endstufe	R-Test	Endstufe	R-Test
Staph. aureus	1.	B-Kultur	neg.	290 000 000	neg.	/	/	/	/
	2.	B-Kultur	##	2015000000	145000 000	/	/	/	/
Staph. aureus apathogen	1.	B-Kultur	neg	250000000	neg	/	/	/	/
	2.	B-Kultur	neg.	455000000	1000 000	/	/	/	±
Staph. albus	1.	B-Kultur	+	1345000000	94330000	/	/	/	/
	2	B-Kultur	neg.	205000000	neg.	/	/	/	/
Staph. aureus CAMP 132 a		B-Kultur	neg	290000000	neg	/	/	/	/
Staph aureus SG 511		B-Kultur	neg.	220000000	neg.	/	/	/	/

Tabelle 13: Errechnete Keimzahlen in den Endverdünnungsstufen mit positivem oder negativem R-Test 24-stündiger Kulturen von vier Streptokokken-Stämmen

	n. 24 Stunden Bebrütung		Vor Bebrütung ermittelte Keimzahl für Endstufe n. 24 Stunden Bebrütung		n. 48 Stunden Bebrütung		n. 72 Stunden Bebrütung	
	Endstufe	R-Test	Direkt	Indirekt	Endstufe	R-Test	Endstufe	R-Test
Vergr. Streptokokken 152166	B-Kultur	neg.	1215000000	51667000	/	/	/	±
Streptokokken 152166	B-Kultur	neg.	1135000000	667000	/	/	/	/
Vergrünende Streptokokken	B-Kultur	±	965000000	neg.	/	/	/	/
Vergrünende Streptokokken	B-Kultur	+	1380000000	2866700	/	/	/	/

Tabelle 14: Errechnete Keimzahlen in den Endverdünnungsstufen mit positivem oder negativem R-Test 24-stündiger Kulturen von zwei Corynebacterium renale-Stämmen

	n. 24 Stunden Bebrütung		Vor Bebrütung ermittelte Keimzahl für Endstufe n. 24 Stunden Bebrütung		n. 48 Stunden Bebrütung		n. 72 Stunden Bebrütung	
	Endstufe	R-Test	Direkt	Indirekt	Endstufe	R-Test	Endstufe	R-Test
Corynebact. renale	B-Kultur	±	1173000000	neg.	/	/	/	/
Corynebact. renale	B-Kultur	+	1690000000	neg	/	/	/	/

Die im Direktverfahren ermittelten Keimzahlen lagen zwischen 1 173 000 000 und 1 690 000 000 Keimen/ 1 ml.

8. Versuche der Keimzahlbestimmung mittels Plattenverfahren in schwach bis stark positiven R-Bouillonkultur-Harnverdünnungen der Stämme E. coli, Pseudomonas aeruginosa und Providencia

Bei diesen Untersuchungen wurde stets von 72 Stunden lang bebrüteten R-Bouillonkultur-Harnverdünnungen guter Formazanbildner ausgegangen. Die Gemische wurden mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt und die durch das kulturelle Plattenverfahren ermittelten Keimzahlen auf 1 ml des R-Bouillonkultur-Harngemisches berechnet. Je nach Stärke der Rotfärbung wurden die Röhrchen zur Keimbestimmung ausgewählt und bei den zu dieser Versuchsreihe benutzten Stämmen (E. coli O 50, E, coli O 56, Providencia 192/ 66 und Pseudomonas aeruginosa 23) die Durchschnittskeimzahl zugrundegelegt.

Es ergaben sich bei dem benutzten Beurteilungsschema für die Rotfärbung folgende Keimzahlen:

rosa	= +	100 000 bis 300 000	Keime / 1 ml
hellrot	= ++	300 000 " 1570 000	Keime / 1 ml
himbeerrot	= +++	2 Mill. " 65 Mill.	Keime / 1 ml
dunkelrot	= ++++	über 65 Mill.	Keime / 1 ml

9. Identifizierungsmöglichkeiten der Bakterienstämme auf Grund der Farb- und Konsistenzänderungen der mit R. beschickten Röhrchen

Aus der Feststellung der Farbveränderungen, des Trübungsgrades, der Bodensätze, der Konsistenzeigenschaften (wäßrig-schleimig), der Niederschläge an den Gefäßwänden und Kahmhautbildung der R-Harngemische ließen sich für die einzel-

nen Stammarten keine charakteristischen Merkmale ableiten. Es konnte lediglich zwischen starken und schwachen Formazanbildnern unterschieden werden mit der Einschränkung, daß die Stärke der Reaktion bei den guten Formazanbildnern wesentlich von der Zahl der in den Röhrchen befindlichen Keime abhängig war, also als Funktion der Vermehrungsaktivität des einzelnen Stammes aufgefaßt werden konnte.

Zu den guten Formazanbildnern waren zu rechnen:

1. Providencia
2. Citrobacter intermedius
3. Aerobacter
4. Alcaligenes
5. E. coli
6. Salmonella
7. Bacterium proteus

Zu den mittelmäßigen Formazanbildnern gehörten Pseudomonas aeruginosa und E. coli-Stämme, die überaltert waren, während der atypische Enterobacter-Stamm, Staphylokokken, Streptokokken und Corynebacterium renale als schlechte Formazanbildner anzusehen waren.

10. R-Test mit Harnen von gesund erscheinenden Hunden

Die Untersuchungen wurden mit 33 verschiedenen Hundeharnen durchgeführt, die die Klinik für kleine Haustiere (Direktor: Prof. Dr. L.-F. Müller) zur Verfügung stellte. Die Harne wurden Hunden, die klinisch gesund waren und keine Verdachtserscheinungen einer Erkrankung der Harnblase und der Harnwege zeigten, mit sterilen Kathetern entnommen, und zwar von 14 Rüden und 19 Hündinnen.

Die Untersuchung erfolgte in der Weise, daß in zwei Reagenzröhrchen je 1,0 ml Harn verbracht und mit 2,0 ml R. versetzt wurde. Gleichzeitig wurden drei Nähragarplatten mit 0,1 ml Harn-Verdünnungen 10^{-1}, 10^{-2} und 10^{-3} beimpft und mit 0,2 ml R. beschickt.

Die 14 Harne der männlichen Tiere zeigten in 12 Fällen einen negativen R-Test, in einem Falle eine Rosafärbung (+) und in einem weiteren Falle eine hellrote Färbung (++) nach 48-stündiger Bebrütung bei 37°C.

In Übereinstimmung mit diesem Ergebnis konnten bei den 12 negativen Proben bei der kulturellen Untersuchung in keinem Falle Keime festgestellt werden.

Bei den positiven Proben wuchsen auf den Platten coliforme Keime (bis zu 6100 Keime / 1 ml) und Streptokokken und Staphylokokken (Keimzahl etwa 2760 Keime / 1 ml).

In den 9 negativen Harnproben wurden kulturell Streptokokken und Staphylokokken etwa bis zu einer Menge von 9000 Keimen / 1 ml festgestellt.

In den 10 positiven Proben wuchsen auf den dazugehörigen Agarplatten coliforme Keime bis zu einer Menge von 23 700 Keimen / 1 ml.

Die Harne der weiblichen Tiere zeigten in 9 Fällen keine Formazanbildung, in 6 Fällen Rosafärbung (+) und in 4 Fällen eine helle Rotfärbung (++) nach 24-stündiger Bebrütung bei 37° C.

Auch hier war in Übereinstimmung damit auf den Platten der Harne, die keine Formazanbildung aufwiesen, ein Wachstum von Streptokokken und Staphylokokken in einer Menge

bis zu 9000 Keimen / 1 ml zu beobachten. Bei den Harnen, die eine Formazanbildung hervorgerufen hatten, wurden außerdem auch coliforme Keime in einer Menge bis zu 23 700 Keimen / 1 ml ermittelt.

11. R-Test mit Harnen von Hunden mit klinischem Verdacht einer Erkrankung der harnableitenden Wege

Die Harne waren Hunden, die als Patienten der Klinik für kleine Haustiere vorgestellt worden waren, unter sterilen Bedingungen entnommen und dem Institut zur bakteriologischen Untersuchung zugeschickt worden.

1,0 ml wurde mit 2,0 ml R. vermischt und 18 Stunden bebrütet. Danach wurde der R-Test abgelesen. An den Harnen wurden wie üblich bakteriologische Untersuchungen unternommen und die Ergebnisse der R-Teste mit denen der bakteriologischen Untersuchung verglichen.

Folgende Harne kamen in dieser Weise zur Prüfung:

1.) Harn eines Pudels, J.-Nr. 258:

Klinischer Befund: Blasensteine
Katheterisierter Harn: übelriechend, schleimig, trüb
R-Test: positiv (++++)
Bakteriolog. Untersuchung: Bact. proteus

2.) Harn eines Boxer-Bastards, J.-Nr. 269:

Klinischer Befund: Cystitis haemorrhagica
R-Test: positiv (+++)
Bakteriolog. Untersuchung: Pseudomonas aeruginosa

3.) Harn eines Cockerspaniels, J.-Nr. 287:

Klinischer Befund: Cystitis
R-Test: positiv (++++)
Bakteriolog. Untersuchung: Atyp. E. coli

4.) Harn eines Pudels, J.-Nr. 292: (gleicher Pudel wie unter 1.)

Klinischer Befund: Haematurie
R-Test: negativ (-)
Bakteriolog. Untersuchung: Keine Bakterien feststellbar

5.) Harn eines Schäferhundbastards, J.-Nr. 296:

Vorbericht: Übermäßige Flüssigkeitsaufnahme
Klinischer Befund: Palpation o. B.
Laboruntersuchungen: Reichlich harnsaure Salze
R-Test: positiv (++++)
Bakteriolog. Untersuchung: Citrobacter, Staph. albus haemolyticus

6.) Harn eines Kurzhaarteckels, J.-Nr. 298:

Vorbericht: Seit Oktober 1965 besteht Teckellähme. Setzt nicht selbständig Harn ab, wird deshalb zweimal täglich katheterisiert. Temp. 40,2°, Erbrechen.
R-Test: positiv (+++)
Bakteriolog. Untersuchung: E. coli (ohne Haemolyse)

7.) Harn eines Langhaarteckels, J.-Nr. 301:

Klinischer Befund: Cystitis
R-Test: positiv (+++)
Bakteriolog. Untersuchung: 1. vergrünende Streptokokken, 2. coliforme Keime (ohne Haemolyse)

8.) Harn eines Bastards, J.-Nr. 304:

Klinischer Befund: s. J.-Nr. 296
R-Test: positiv (++++)
Bakteriolog. Untersuchung: Citrobacter intermedius

9.) Harn eines Schäferhundbastards, J.-Nr. 348:

Klinischer Befund: s. J.-Nr. 296
R-Test: negativ (-)
Bakteriolog. Untersuchung: keine Bakterien feststellbar

10.) Harn eines Teckels, J.-Nr. 367:

Klinischer Befund: Cystitis
R-Test: positiv (+++)
Bakteriolog. Untersuchung: coliforme Stäbchen

In den acht Fällen, in denen ein positiver R-Test ermittelt werden konnte, ergab die bakteriologische Untersuchung das Vorliegen guter Formazanbildner.

Zwei Hundeharne (Schäferhundbastard Nr. 9 und Pudel Nr. 4), die bakteriologisch negativ waren, zeigten einen negativen R-Test. Die Harnprobe des Pudels wurde zweimal im Abstand

von zehn Tagen untersucht. Bei der ersten Untersuchung (Nr. 1) war der R-Test eindeutig positiv und wurden Proteuskeime festgestellt. Die zweite Untersuchung erfolgte nach Behandlung. Der Vorbericht besagte, daß eine Haematurie vorliegen würde. Die Harnprobe war entsprechend rot gefärbt. Sie wurde durch Verdünnung von 0,2 ml des Harnes mit 0,8 ml physiologischer Kochsalzlösung aufgehellt und dann der R-Test mit 1,0 ml des verdünnten Harnes angesetzt. Der R-Test hatte ein negatives Ergebnis, ebenso war die bakteriologische Untersuchung des unverdünnten Harnes negativ.

12. R-Test mit Harn von fünf Rindern

Spontanharn mit einem p_H-Wert von 7,2 bis 5,4 wurde in üblicher Weise filtriert und von 24-stündigen Bouillonkulturen zehn verschiedener Bakterienstämme (Pseudomonas aeruginosa Nr. 23, Citrobacter intermedius 82/66, E. coli 92/66, E. coli O 50, Salmonella typhi murium, Aerobacter cloacae 865/64, Proteus vulgaris 342/66, Alcaligenes 340/66, vergrünende Streptokokken 152 A/66 und atypischer Enterobacter G 51/66) Verdünnungen (10^{-1} bis 10^{-8}) hergestellt.

Bei allen fünf Harnen kam es in den Verdünnungen bis 10^{-8} zu einer Formazanbildung, ausgenommen bei den Verdünnungen, die mit Streptokokken und atypischem Enterobacter hergestellt worden waren.

Die Kontrollröhrchen, bei denen eine Beimpfung mit Keimen unterblieb, waren negativ.

Zwei Harne waren als fraglich (rosarote Knopfbildung) zu beurteilen.

13. R-Test mit Mittelstrahlharn von zwölf Rindern

Von zwölf Rindern wurden Mittelstrahlharne gewonnen und je 1,0 ml mit 2,0 ml R. versetzt und bei 37° C bebrütet. Jeweils drei Platten wurden in den Verdünnungen von 10^{-1} bis 10^{-3} mit Harn und R. beimpft und ebenfalls bebrütet.

Sechs Harne zeigten keine Formazanbildung, zwei Harne eine fragliche und vier Harne eine Rosafärbung nach 24-stündiger Bebrütung.

Auf den beimpften Platten waren bei den Harnen ohne Formazanbildung Streptokokken und Staphylokokken in einer Menge bis zu 470 Keimen / 1 ml, bei den Harnen mit fraglichem Ergebnis coliforme Keime bis zu 4 Keimen / 1 ml und bei den Harnen mit Rosafärbung coliforme Keime in einer Menge bis zu 142 Keimen / 1 ml gewachsen.

14. Vergleichende Untersuchungen mit keimfrei filtrierten Menschen-, Hunde- und Rinderharn

Je ein Menschen-, Hunde- und Rinderharn standen als Verdünnungsmedien für die Bouillonkulturen zur Verfügung. Fünf verschiedene E. coli-Stämme (E. coli O 18, E. coli W 36, E. coli O 50, E. coli O 52, E. coli 92/66) wurden benutzt. Die Verdünnungen wurden bis 10^{-8} durchgeführt und wie üblich mit diesen der R-Test vorgenommen. Menschen- und Hundeharn zeigten weitgehend gleiche Ergebnisse des R-Testes, wobei auch in den verschiedenen Verdünnungen der Grad der Rotfärbung übereinstimmte. Bei der Rinderharnprobe kam es nur zu einer Formazanbildung bis zur Verdünnung 10^{-4}. Auch nach 72-stündiger Bebrütung änderte sich an diesem Ergebnis nichts.

B e s p r e c h u n g

Das 2, 3, 5-Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) wird schon seit langem zum Nachweis reduktasepositiver Bakterien benutzt. Die Zahl dieser Bakterienarten ist so groß, daß es nahe lag, mit dem TTC einen indirekten Nachweis von Keimarten in Milch, Wasser, Speiseeis und Klärschlamm durchzuführen. SCHÖNBERG (40) empfahl, TTC einer Nährbouillon in einer Menge von 0,2 % zuzusetzen. Der Vorzug des TTC bestand darin, daß coliforme Keime das farblose TTC zu rotem Formazan reduzierten und daß TTC gleichzeitig andere als coliforme Keime im Wachstum hemmte. Auch für die Zwecke der kulturellen Keimzahlbestimmung haben SCHÖNBERG und KRAUS (41) empfohlen, gewöhnlichem Nähragar-Laktose und TTC zuzusetzen, weil die nach der Bebrütung auf dieser Platte gewachsenen coliformen Kolonien durch ihre rote Farbe besser zu erkennen sind als auf der bis dahin benutzten Bromthymolblau-Trypaflavin-Laktose-Agarplatte und andere als coliforme Keime in ihrem Wachstum gehemmt werden.

BUCKSTEEG und THIELE (6) zogen die TTC-Bouillon den bis dahin verwendeten Nährmedien bei der Untersuchung von Klärschlamm vor. Die Autoren versuchten, durch photometrische Messungen der mit Klärschlamm beimpften TTC-Bouillons zu einer Keimzahlbestimmung zu kommen, um Aufschlüsse über die biologische Aktivität zu erhalten. Dadurch wurden unter anderem störende Einflüsse bei biologischen Kläranlagen rechtzeitig erkannt. Auch hatten die Autoren (5) das TTC zur Ermittlung der Gesamtkeimzahl in der Wasserbakteriologie benutzt, und das TTC hatte sich bei der Auszählung der Kolonien als recht brauchbar erwiesen, da auch sehr kleine Kolonien sich noch durch ihre Rotfärbung erfassen ließen.

Durch Rotfärbung der Kolonien reduzierender Bakterien kam es bei den Kolonien zu bestimmten Farbnuancierungen und einem Hervortreten einzelner Koloniemerkmale, die bei farblosem Zustand unbemerkt geblieben oder nicht deutlich genug zu sehen waren.

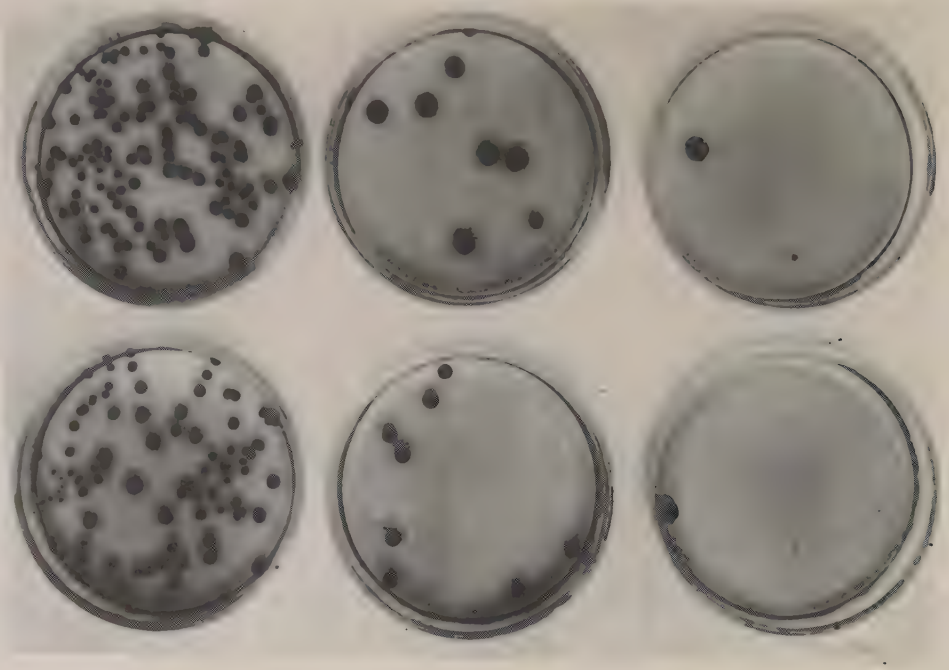
HUDDLESON (13) beeindruckte die Rotfärbung der auf 0,01 %igen TTC-Nähragar gewachsenen Brucellenkolonien so sehr, daß er glaubte, auf Grund der Koloniemerkmale zu einer Unterscheidung verschiedener Varianten gelangen zu können.

Im Hinblick auf die große Erfassungsbreite des TTC und der guten Erfahrung, die man bei der Bestimmung coliformer Keime und indirekten Keimzählung mit dem TTC gesammelt hatte, lag es nahe, anzunehmen, daß das TTC sich auch zum Nachweis von Bakterien in menschlichen und tierischen Harnen eignen würde. Dies umso mehr, als im Harn bei Krankheitszuständen der Nieren, der Harnblase oder der abführenden Harnwege Bakterienarten vorherrschen, die reduzierende Eigenschaften haben (s. Lit. KLEMM (18) und LANGE (25)).

Eine unter der Bezeichnung R u b r o g n o s t TTC-haltige Nährlösung wird von der Firma Heyl & Co. zum Nachweis coliformer Keime in Wasser und Milch empfohlen und war daraufhin zu prüfen, ob sie sich auch zum Nachweis coliformer Keime im Harn eignen würde.

Nach SCHÖNBERG (37) ist mit einer optimalen Anzeigefähigkeit des TTC für coliforme Keime in der Milch bei p_H-Werten von 7,5 bis 8,0 zu rechnen. Dieser Mitteilung steht eine Feststellung von PAPAVASSILIOU (34) gegenüber, der in Milch beim Nachweis von E. coli einen p_H-Wert von 6,0 bis 6,5 als optimal ansieht.

Mit Bouillonkultur-Harnverdünnungen (10^{-6}, 10^{-7} und 10^{-8}) und mit Rubrognost beimpfte Nähragarplatten nach 48-stündiger Bebrütung



Diese, wenn auch unterschiedlichen Angaben, ließen vermuten, daß mit der Möglichkeit eines störenden Einflusses höherer oder niedrigerer p_H-Werte auf die Formazanbildung im Harn zu rechnen war.

In dieser Richtung mit sterilen Harnproben durchgeführte Untersuchungen ergaben, daß p_H-Werte im Bereich von 5,0 bis 9,5 den Vorgang der Reduktion weder hemmten noch förderten. Jedenfalls konnten beim Vorhandensein reduzierender Bakterien gleich gute Rotfärbungen beim Rubrognost-Test in saurem und alkalischem Harn festgestellt werden. Auch die Ergebnisse mit frischen und alten, stark alkalisierten Harnproben waren in etwa gleich.

In einer besonderen Versuchsreihe wurde noch geprüft, ob das zur Gläserreinigung benutzte Pril die Formazanbildung beeinflußte. Dabei zeigte es sich, daß selbst bei großen Mengen Pril, die den verschiedenen Verdünnungen beigemischt wurden, keine Formazanbildung eintrat.

Versuche, die mit Filtraten von Bouillonkulturen und Rubrognost durchgeführt wurden, bestätigten durch ihren negativen Ausfall die Feststellung von HIRSCH und CATTANEO (11), daß die Reduktion des TTC zu Formazan an lebende Bakterien gebunden ist.

Die weiteren Untersuchungen bemühten sich um die Frage, welche Keimarten das Rubrognost erfassen und welche Anzeigekraft es in bakterienhaltigen Harnen besitzt. Deshalb wurden Bouillonkulturen der verschiedensten Keimarten mit sterilem Harn verdünnt (10^{-8}), um sie durch den Rubrognost-Test zu prüfen. Die Versuche ergaben, daß Bakterien der Gattungen Providencia, Citrobacter, Aerobacter, Alcaligenes, E. coli, Salmonella, Proteus und Pseudomonas schnell und ausgeprägt eine Rotfärbung bewirkten, die proportional dem Verdünnungsgrad der Bakteriensus-

pensionen von dunkelrot bis rosa überging. Bakterien der Gattung Enterobacter, Staphylococcus, Streptococcus und Corynebacterium renale wiesen in Harnverdünnungen keine Rotfärbung auf, was an einer vermehrungshemmenden Wirkung des TTC im Rubrognost zu liegen scheint. Vollkommen negativ verliefen die Versuche mit Clostridium perfringens.

Was die Anzeigestärke für geringe Keimzahlen anbetrifft, so ist bemerkenswert, daß wenige Keime im Harn genügten, um eine Rotfärbung des Rubrognost-Harngemisches hervorzurufen. Es ist dabei allerdings zu berücksichtigen, daß das Rubrognost ein Nährmedium mit TTC darstellt, das während der Bebrütung eine Vermehrung der Keime ermöglicht. Es wird daher die Formazanbildung durch eine größere Zahl von Keimen bei der Vermehrung ausgelöst. In der Regel war die Rotfärbung schon nach 24 Stunden Bebrütung bei 37° C eingetreten. Sie verstärkte sich aber noch, wenn die Bebrütung auf 48 und 72 Stunden ausgedehnt wurde.

Die Intensität der Rotfärbung war von der im Harn vorliegenden Keimart und davon abhängig, ob der Harn mit einer frischen oder alten Bouillonkultur beimpft worden war, und ob im Harn eine große oder geringe Keimzahl vorlag. Sie war am stärksten bei den coliformen Keimen wie Citrobacter intermedius, Aerobacter cloacae, E. coli und den Alkalibildnern wie Alcaligenes und Salmonella ausgeprägt. In den hohen Verdünnungen war die Farbe nach 24-stündiger Bebrütungszeit oft nur rosarot.

Wenn auch die meisten Versuche mit menschlichem Harn durchgeführt wurden, so kamen aber auch, um dem Einwand zu begegnen, daß die Ergebnisse nicht für tierische Harne zutreffen, Harnproben von Hund und Rind zur Prüfung. Dabei zeigte es sich, daß die mit Hunde- und Rinderharnproben erzielten Reaktionen die Versuchsergebnisse, die bei menschlichen Harnproben erlangt wurden,

gleichartig verliefen

Insgesamt wurden zehn Harnproben von Hunden, die klinisch den Verdacht auf eine Erkrankung ergaben, im Rubrognost-Test geprüft. Der Rubrognost-Test hatte in acht Fällen ein positives Ergebnis, wobei die bakteriologische Untersuchung in jedem Falle den Nachweis von coliformen Keimen erbrachte.

Mit dem Nachweis der im Hundeharn vorkommenden Keimarten haben sich KLEMM (18) und LANGE (25) auch im Zusammenhang mit der keimfreien Gewinnung von Harnproben beschäftigt. Beide Autoren kamen zu der Feststellung, daß bei Hunden, die an Erkrankungen der Nieren, der Harnblase und der Harnwege leiden, in der Hauptsache coliforme Keime, Staphylokokken, Streptokokken, Corynebakterien, Pseudomonaskeime und Proteusbakterien vorkommen. Ein wesentlicher Teil dieser Keimarten wird, wie die eigenen Untersuchungen ergeben haben, durch das Rubrognost angezeigt, und zwar auch dann, wenn sie in geringer Zahl vorliegen. Einzuschränken bleibt aber nach wie vor, daß das Ergebnis des Rubrognost-Testes immer nur dann gilt, wenn die Harnproben unter sterilen Bedingungen entnommen worden sind, bei der Entnahme also alle Vorkehrungen getroffen wurden, die geeignet sind, eine nachträgliche Verunreinigung des Harnes auszuschließen.

Unter diesen Voraussetzungen kann das Rubrognost als einfacher Indikator zum Nachweis von Keimarten, die häufig im Hundeharn enthalten sind, Verwendung finden und dem praktischen Tierarzt als klinisches Orientierungsmittel empfohlen werden.

Der Rubrognost-Test ermöglicht nicht, auf eine Feststellung einer vorliegenden Keimart zu verzichten, zumal, wenn es um die Frage einer gezielten Therapie geht und wenn ein Interesse daran besteht, zu erfahren, gegenüber welchen Antibiotika oder sonstigen Präparaten die spezielle Keimart empfindlich ist.

Das Rubrognost hat sich bei unseren Untersuchungen ganz besonders bei der Keimzahlbestimmung mit dem Plattenverfahren bewährt. Es wurde in einer Menge von 0,2 ml und 0,1 ml verdünnter Bakteriensuspensionen auf die Oberfläche einer gewöhnlichen Nähragarplatte gegeben und gut verteilt. Nach 24-stündiger Bebrütung war es zur Entwicklung himbeerrotgefärbter Kolonien gekommen, die sich auch bei etwas dichterem Wachstum gut erkennen und demzufolge gut auszählen ließen.

Der Einwand, daß das in dem Rubrognost enthaltene TTC die Vermehrung der coliformen Keime hemmt, konnte widerlegt werden. Jedenfalls zeigten entsprechende Versuche, daß kulturelle Keimzahlbestimmungen auf Nähragar mit und ohne Rubrognost zu etwa gleichen Ergebnissen führten. Auch bestand eine hinlängliche Übereinstimmung zwischen den Keimzahlen, die mit der direkten und indirekten Keimzählungsmethode erzielt worden war.

Bei Agar, dem TTC von vornherein zugesetzt wird, besteht eine begrenzte Haltbarkeit des TTC in dem Nährboden. Deshalb ist es nach unserem Dafürhalten günstiger, gewöhnliche Agarplatten vorrätig zu halten und diese erst bei der Beimpfung mit Keimsuspensionen mit dem Rubrognost zu beschicken.

Zusammenfassung

1. Das Rubrognost der Firma Heyl & Co, Berlin, eignet sich zur orientierenden Untersuchung von Menschen- und Hundeharnen auf reduktasebildende Keime und kann für den praktischen Tierarzt bei der klinischen Diagnose von Krankheiten des Urogenitalapparates beim Hunde eine Hilfe sein. Bei Spontanharnproben, die in der Regel nicht keimfrei sind, ist daher der Rubrognost-Test mit einer gewissen Vorsicht anzuwenden. Dies ist ein Nachteil, weil eine Aussage über das Vorhandensein coliformer Bakterien jedoch nur möglich ist, wenn die Harnproben unter sterilen Bedingungen gewonnen werden.

2. Geringe Keimzahlen von Bakterien mit reduzierenden Eigenschaften im Harn genügen beim Rubrognost-Test, um im Harn ein positives Ergebnis hervorzurufen.

3. Mit dem Rubrognost werden nicht nur coliforme Keime, sondern auch Pseudomonas aeruginosa, Bacterium proteus, Alcaligenes und Salmonellen erfaßt. Alle diese Keime können im Hundeharn vorkommen.

4. Hunde-, Rinder- und Menschenharne haben keinen Einfluß auf das Ergebnis des Rubrognost-Testes. Selbst bei stark sauren und alkalischen Harnen werden reduktasebildende Keime angezeigt. Es ist jedoch zu empfehlen, mit dem Rubrognost-Test möglichst frische Harnproben zu untersuchen.

5. Ein positives Ergebnis des Rubrognost-Testes tritt nur bei Keimen ein, die sich im Rubrognost-Harngemisch vermehren. Geringe Keimzahlen genügen, um ein positives Ergebnis herbeizuführen. Demzufolge läßt sich auf Grund eines positiven Ergebnisses über die ursprünglich im Harn vorhandene Keim-

zahl keine Aussage machen. Damit entfällt die bei bakteriologischen Untersuchungen von Harnproben gegebene Möglichkeit, durch Keimzählungen eine Unterscheidung der im Harn primär vorhandenen oder sekundär in den Harn gelangten Keimzahlen zu treffen.

6. Das Gläserspülmittel "Pril" beeinflußte das Ergebnis des Rubrognost-Testes nicht.

7. Das Rubrognost erweist sich ebenfalls für eine kulturelle Zählung reduktasebildender Keime auf der gewöhnlichen Nähragarplatte als geeignet. Die rote Farbe erleichtert die Erkennung der Kolonien. Außerdem hat die Benetzung der Agaroberfläche mit Rubrognost bei der Übertragung der keimhaltigen Suspension den Vorteil, daß eine Veränderung des Triphenyltetrazoliumchlorids bei der Aufbewahrung nicht zu befürchten ist.

Literaturverzeichnis

1. BAEDER, P. C. — Untersuchungen über das Vorkommen von sich gegenseitig antibiotisch beeinflussenden Bakterien im Harn des Hundes. Berlin F. U. Vet.med. Diss. 1961

2. BIELIG, H. J., KAUSCHE, G. A. und H. HAARDICK — Über den Nachweis von Reduktionsorten in Bakterien. Zschr. Naturforsch. 4 b, 80, 1949

3. BORMAN, E. K., STUART, C. A. und K. WHEELER — Taxonomy of the family Enterobacteriaceae. J. Bact. 48, 351, 1944

4. BRUUN JENSEN, J. — Triphenyltetrazolium-Chloride Test. Lancet 1247, 1965, II

5. BUCKSTEEG, W. und H. THIELE — Verbesserungen der Keimzähltechnik in der Wasserbakteriologie durch Anwendung von 2-3-5 Triphenyltetrazoliumchlorid. Zbl. Bakt. II. Abt. 111, 235, 1958

6. BUCKSTEEG, W. und H. THIELE — Die Beurteilung von Abwasser und Schlamm mittels TTC (2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid). Wasser und Abwasser 36, 456, 1959

7. CHAPMAN, A. H. — A culture medium for detecting and confirming Escherichia coli in ten hours. Amer. J. Publ. Health, 41, 1381, 1951

8. GERTH, R. — Über das Verhalten bestimmter in der Milch vorkommender Keime auf Triphenyltetrazoliumchlorid-Agar unter besonderer Berücksichtigung des Reduktasebildungsvermögens bestimmter Keimarten. Hannover Vet.med. Diss. 1956

9. HALLMANN, L. — Bakteriologie und Serologie. Thieme, Stuttgart, 3. Aufl., 181, 1961

10. HEYL, W., HOLTHOFF, H.-J. und W. SCHÖNBORN
Milchwiss. 12, 213, 1957

11. HIRSCH, A. und C. CATTANEO
Die Mycobakterien: Chemischer Aufbau und Virulenz
III. Die Reduzierung von Triphenyltetrazoliumchlorid durch Mycobakterienstämme verschiedener Species
Z. Hyg. Inf. Kr. 145, 71, 1958

12. HIRSCH, A., CATTANEO, C. und P. MAGGINI
Über den Aufbau der Mycobakterien
III. Der Nachweis von Stoffwechselvorgängen mittels elektronenoptischer Untersuchung von Ultradünnschnitten der Zellen verschiedener Mycobakterienspecies (Reduzierung von 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid)
Zbl. Bakt. I. Orig. 174, 514, 1959

13. HUDDLESON, I. F. u. a.
Studies in Brucellosis III
Mich. State College, East Lansing 4. T., 77, 1951

14. KAUFFMANN, F.
Enterobacteriaceae
Collected studies on Salmonella, Arizona, Ballerup-Bethesda, Escherichia, alcalescens-Dispar, Klepsiella, Shigella, Providence and Proteus
Munksgaard, Copenhagen, 1951

15. KLEIN, H.
Ein Beitrag zur Coli-Titer-Bestimmung in Milch
Berl.Münch. tierärztl. Wschr. 68, 58, 1955

16. KLEIN, H.
Ein weiterer Beitrag zur Coli-Titer-Bestimmung der Milch
Zur Brauchbarkeit des Bromthymolblau-Trypaflavin-Agars und des Triphenyl-Tetrazolium-Chlorid-Agars auf Grund von Keimdifferenzierungen
Berl. Münch. tierärztl. Wschr. 68, 133, 143, 1955

17. KLEIN, E. — Ein Beitrag zur Wirkungsweise des Triphenyl-Tetrazolium-Chlorids im Triphenyl-Tetrazolium-Chlorid-Agar bei der Coli-Titer-Bestimmung in der Milch
Berl. Münch. tierärztl. Wschr. 68, 214, 1955

18. KLEM., G. — Keimarten und Keimzahlen bei Spontan- und Katheter-Harnproben von Hunden
Berlin F. U., Vet. med. Diss. 1958

19. KLIMER, M. und F. SCHÖNBERG — Milchkunde und Milchhygiene
Schaper, Hannover, 6. Aufl., 250, 1951

20. KRAUß, B. — Über die Bestimmung des Redoxpotentials in Milch
Kieler milchwiss. Forschungsber. 2, 127, 1950

21. KUHN, R. und D. JERCHEL — Reduktion von Tetrazoliumsalzen durch Bakterien, gärende Hefe und keimende Samen
Ber. Dtsch. Chem. Ges. 74, Abt. B., 941, 1941

22. LAKSHMINARAYANA, H. und K. K. IYA — zit. n. Worseck und Holst
Ind. J. Dairy Sci. 6, 75, 1953

23. LAKSHMINARAYANA, H. und K. K. IYA — zit. n. Worseck und Holst
Ind. J. Dairy Sci. 7, 83, 1954

24. LAKSHMINARAYANA, H. und K. K. IYA — zit. n. Worseck und Holst
Ind. J. Dairy Sci. 8, 32, 1954

25. LANGE, W. — Bakteriologische Untersuchung an Harnorganen des Hundes unter Berücksichtigung der pathologischen Befunde an den Hundenieren
Berlin F. U., Vet.med. Diss. 1963

26. LAUBINGER, G. — Urinbefunde bei der chronischen Pyelonephritis
Med. Klin., 56, 750, 1961

27. LIENHOP, E. — Nachweis einer Lebensmittelvergiftung durch Bact. proteus unter Verwendung von TTC-Agar. Lebensmitteltierarzt, 5, 115, 1954

28. MALAMOS, B., DIAMOS, G. K., ALHANASIADON, M. und E. DERNITZAKIS — Probleme der Behandlung von Harnwegsinfektionen. Ärztl. Wschr. 14, 964, 1959

29. MANN, E. J. — zit. n. Worseck und Holst. Dairy Industries, 20, 966, 1956

30. MÖLLER, E. F. — Nährstoffe und Wuchsstoffe der Milchsäurebakterien. Angew. Chem., 53, 204, 1940

31. MURÁNY, F. — A time-saving micromethod for testing desinfectants with Triphenyltetrazoliumchloride. Acta vet. Acad. scient. Hung. 9, 343, 1959

32. MUSTAKALLIO, K. K., AHOS, E. O. und E. O. AUTIO — Tetrazolium-reduction test for milk. Science, 122, 971, 1955

33. NOACH, R. — Über die Möglichkeit einer einfachen Stufenkontrolle in Molkereien und Vorzugsmilchanstalten zur Feststellung des Coligehaltes der Milch unter Benutzung des Bromthymolblau-Trypaflavin-Laktose-Agars und des T.T.C.-Agars. Hannover, Vet.med. Diss., 1954

34. PAPAVASSILIOU, J. — Die Untersuchung pasteurisierter Milch mit einem TTC-haltigen Nährmedium. Milchwiss., 15, 183, 1960

35. PECHMANN, H. v. und P. RUNGE — zit. n. Schönberg. Ber. Dtsch. Chem. Ges., 27, 2920, 1894

36. SACHSE, H. und H. POSER — Zur Nachweismethodik der Bakteriurie. Zbl. Bakt., Abt. I. Orig., 184, 538, 1962

37. SCHÖNBERG, F. — Zur Brauchbarkeit der Tetrazoliumsalze für die Reduktaseprobe (indirekte Keimzahlbestimmung) in Milch
Lebensmitteltierarzt, 4, 52, 1951

38. SCHÖNBERG, F. — Zum quantitativen Nachweis des Bact. coli (Escherichia coli) in Milch und Wasser mit Hilfe von Triphenyltetrazoliumchlorid-Agar (T.T.C.-Agar)
Lebensmitteltierarzt, 4, 137, 1953

39. SCHÖNBERG, F. — Nochmals zum quantitativen Nachweis des Bact. coli (Escherichia coli) in Milch und Wasser auf Triphenyltetrazoliumchlorid-Agar (T.T.C.-Agar)
Lebensmitteltierarzt, 4, 176, 1953

40. SCHÖNBERG, F. — Zum Nachweis coliformer Bakterien in Milch mit Hilfe von TTC-Bouillon
Lebensmitteltierarzt, 5, 116, 1954

41. SCHÖNBERG, F. und H. KRAUS — Zur weiteren Verbesserung des TTC-Agars für die elektive Feststellung von coliformen Keimen in Milch und Wasser durch Laktosezusatz und zur Brauchbarkeit des Bromthymolblau-Trypaflavin-Laktose-Agars
Lebensmitteltierarzt, 5, 194, 1954

42. SEELEMANN, M. und K. H. WEGENER — Zum Nachweis von Escherichia-Aerobacter-Keimen in Milchproben Stellungnahme zur Auslegung des Begriffes "coliforme Bakterien"
Milchwiss., 11, 51, 1956

43. SIMMONS, N. A. und J. D. WILLIAMS — Ein einfacher Test für die Signifikanz einer Bakteriurie
Lancet 1377, 1962

44. STRAUS, F. H., CHERONIS, N. D. und E. STRAUS — Demonstration of reducing enzyme systems in neoplasms and living mammalian tissues by Triphenyltetrazolium-chloride
Science 108, 113, 1948

45. STÜTTGEN, G. — Messungen des Reduktionsvermogens des menschlichen Serums mit dem Indicator Triphenyltetrazoliumchlorid

Klin-Wschr., 29, 766, 1951

46. WORSECK, M. und W. HOLST — Probleme der TTC-Reduktion in der Milchwirtschaft

Berl. Münch. tierärztl. Wschr. 72, 87, 1959

47. WUNDT, W. — Untersuchungen über die Reduktionswirkungen von Bakterien auf Triphenyltetrazoliumchlorid

Dtsch. med. Wschr., 75, 1471, 1950

Es ist mir ein besonderes Anliegen, an dieser Stelle Herrn Professor Dr. Hartwigk für die Überlassung des Themas und die mir immer gewährte freundliche Unterstützung herzlich zu danken.

Lebenslauf

Am 25. März 1936 wurde ich, Armin Landmann, als Sohn des Landwirtes Armin Landmann und seiner Ehefrau Luise, geb. Kreße in Predel Kreis Zeitz geboren.
Nach dem Besuch der Volksschule in Reuden von 1944 bis 1952 und der Oberschule in Zeitz von 1952 bis 1956 legte ich dort Ende Mai 1956 die Reifeprüfung ab.
Trotz mehrerer Bewerbungen und guter Noten wurde ich nicht zum Studium der Veterinärmedizin an einer der Universitäten Mitteldeutschlands zugelassen. Kurz entschlossen siedelte ich nach West-Berlin um und besuchte vom 1. Oktober 1956 an das Goethe-Gymnasium in Wilmersdorf, wo ich am 3. Juli 1957 das Abitur bestand.
Im Wintersemester 1957/ 58 begann ich das Studium der Veterinärmedizin an der Freien Universität Berlin. Aus gesundheitlichen Gründen war es mir erst im April 1961 möglich, die Vorprüfung abzulegen, und am 4. Dezember 1964 bestand ich die tierärztliche Prüfung an der Freien Universität Berlin.
Meine Praktikantenzeit absolvierte ich bei den praktischen Tierärzten Dr. K. Sommer in Menzingen, Kr. Bruchsal, vom 1. Januar 1965 bis 28. Februar 1965 und Dr. E. Stadler in Wiesloch, Kr. Heidelberg, vom 1. März bis 30. Juni 1965.
Vom 1. Juli 1965 bis zum 29. September 1965 arbeitete ich als Vertreter in Nordbaden und Württemberg.
Seit dem 1. Oktober 1965 bin ich als Doktorand im Institut für Veterinärhygiene der Freien Universität Berlin tätig.
Die Approbation erhielt ich am 1. Juli 1965.